

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506994

(P2005-506994A)

(43) 公表日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/22	A 6 1 K 37/24	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-537565 (P2003-537565)	(71) 出願人	500203709
(86) (22) 出願日	平成14年10月22日 (2002.10.22)		アムジェン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月22日 (2004.4.22)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/033875		2 0, サウザンド オークス, ワン
(87) 国際公開番号	W02003/034996		アムジェン センター ドライブ
(87) 国際公開日	平成15年5月1日 (2003.5.1)	(74) 代理人	100068526
(31) 優先権主張番号	60/336, 394		弁理士 田村 恭生
(32) 優先日	平成13年10月22日 (2001.10.22)	(74) 代理人	100103230
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 高山 裕貢
		(74) 代理人	100087114
			弁理士 齋藤 みの里

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト脂肪組織萎縮症を処置するためのレプチンの使用および該処置のための素因決定方法

## (57) 【要約】

レプチン、レプチン類似体およびレプチン誘導体は、脂肪組織萎縮症に罹患している患者の処置のために用いられる。レプチンは、該疾患の遺伝性および後天性型両方のリポジストロフィ状態に対して有効である。レプチンの治療上有効な量は、皮下および遺伝子治療を用いた方法を含む様々な方法にて、投与することができる。本発明の方法は、処置前に約 4 ng / ml 以下のレプチンレベルを有する患者に対するレプチン、レプチン類似体およびレプチン誘導体の投与を開示する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体による処置に応答する脂肪組織萎縮症患者の素因を決定する方法であって、

(a) 該処置の前に患者のレプチンレベルを決定すること；および

(b) レプチンレベルが約 4 ng / ml 以下かどうかを確認すること、  
を包含する方法。

**【請求項 2】**

該患者が男性であり、該レプチンレベルが処置前に約 2 ng / ml 以下である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

該患者が女性である請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体による処置に応答する脂肪組織萎縮症患者の素因を決定する方法であって、

(a) 該処置の前に患者のレプチンレベルを決定すること；および

(b) (i) 男性患者が約 2 ng / ml 以下、または (ii) 女性患者が約 4 ng / ml 以下のレプチンレベルかどうかを確認すること、

を包含する方法。

**【請求項 5】**

該レプチンレベルが抗体免疫アッセイによって決定される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6】**

プロテアーゼ阻害物質、およびレプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体の組合せを含む医薬的療法を包含する、脂肪組織萎縮症を処置するための方法。

**【請求項 7】**

レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体、およびチアゾリジンジオン、フィブレート、スタチンおよびメトホルミンからなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物の組合せを含む医薬療法を包含する、脂肪組織萎縮症を処置するための方法。

**【請求項 8】**

レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体を投与することを含む、脂肪組織萎縮症に関連する代謝異常に罹患したヒトを処置するための方法。

**【請求項 9】**

レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体の有効量を投与することを含む、後天性型の疾患である脂肪組織萎縮症の状態に罹患したヒト患者を処置するための方法。

**【請求項 10】**

後天性型の脂肪組織萎縮症が、HIV 陽性患者における高活性抗レトロウイルス剤療法 (HAART) に関連する、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体による処置に応答する脂肪組織萎縮症のヒト患者の素因を決定するための改良したキットであって、該改良には、該レプチン処置の前の患者のレプチンレベルが：

(i) 該患者が男性の場合に約 2 ng / ml 以下であり、または

(ii) 該患者が女性の場合に約 4 ng / ml 以下である、  
かどうかを決定するための手段が含まれるキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

(政府の利益)

本発明は、一部を NIH からの財源によって支援された。政府は本発明にて一部の権利を有する。

10

20

30

40

50

## 【0002】

(関連した出願の相互参照)

本出願実用特許は、2001年10月22日出願の米国仮出願番号60/336394 (Depaoli et al.) に対して優先権を主張し、その開示内容は引用により本明細書に包含される。

## 【0003】

(発明の属する技術分野)

本発明は、ヒト脂肪組織萎縮症の処置のためのレプチン、レプチン類似体、およびレプチン誘導体の治療的使用の分野に関連する。

## 【0004】

(発明の背景)

本明細書中に引用するすべての文献は、引用により本明細書に包含される。引用した文献はすべて、詳細な説明の末尾に掲載している。

## 【0005】

脂肪組織萎縮症(リポジストロフィとしても知られる)症候群は、脂肪または脂肪組織の欠乏によって特性化される症候群の多様な群である。代謝異常もまた、この状態に関連するかもしれない。これらの代謝異常は、通常、糖尿病に伴って起こる高トリグリセリド血症および重度のインスリン抵抗性を含む(Reitmann et al., 2000)。ヒトでの脂肪組織萎縮症は、遺伝性または後天性であり得る。脂肪組織萎縮症には2つ以上の遺伝型がある。例えば、ラミンA/C(LMNA)をコードする遺伝子の変異は、ダニガン型家族性部分的リポジストロフィ(FPLD)と関連していることが示唆されている(Cao et al., 2000)。ダニガンFPLDである個体は、正常な脂肪分布をもって生まれるが、思春期には内臓および頭および首の脂肪組織を除き、皮下脂肪および体幹性脂肪の進行性欠損を生じる。異なる染色体領域(9p34)はまた、先天性全身リポジストロフィの疾患遺伝子に関連している(Garg et al., 1999)。先天性全身リポジストロフィは、出生からの脂肪組織のほぼ完全な欠乏、インスリン抵抗性、高トリグリセリド血症および黒色表皮症によって特性化される劣性遺伝疾患である。

## 【0006】

ヒトの脂肪組織萎縮症のいくつかの型は、後天性である。例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染し、かつ高活性抗レトロウイルス剤療法(HAART)で処置されている多くの患者は、増加した内臓脂肪およびクッシング症候群にて観察されるのと同様の「バッファロ・ハンプ」を伴った、顔、肢部および胴体の皮下脂肪の欠損によって特性化される部分的リポジストロフィを生じる。これらの患者は、さらにインスリン抵抗性および高トリグリセリド血症のような代謝障害を生じる場合がある。後天性型の脂肪組織萎縮症はさらに、若年性皮膚筋炎および他の自己免疫疾患に関連している場合もある。

## 【0007】

動物モデルにおける研究により、これらの代謝異常が脂肪欠損に関連していることが明らかにされた(Gavrilova et al., 2000)。しかし脂肪組織萎縮症の特性を示すインスリン抵抗性および高トリグリセリド血症は、様々な手法を試したにもかかわらず処置に対して非常に不応性であった(Garg, 2000)。これらの手法のうち1つは、PPAR(ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)アゴニストであるチアゾリジンジオンによる処置である。チアゾリジンジオンは脂肪細胞分化およびインスリン感受性の両方を促進するため魅力的であるが、チアゾリジンジオンを受ける患者は、高投与量インスリン、経口低血糖物質(例えば、メトホルミンおよびチアゾリジンジオン)、および脂質低下薬物(例えば、フィブラートおよびスタチン)を含む組合せ治療で通常管理される。これらの治療にもかかわらず、全身性脂肪組織萎縮症の患者は、重度の高トリグリセリド血症(急性膵炎の再発性の原因となる)、重度の高血糖症(糖尿病性網膜症および腎症の危険をもたらす)、および非アルコール性脂肪性肝炎(結果として肝硬変になりうる)の症状が続く(Arioglu et al., 2000)。実際、チアゾリジンジオン類の1つ、トログリタゾンは、まれであるが重度の肝細胞毒が原因で米国市場から排除され、2つのチアゾリジンジオン(ロシグリタゾ

10

20

30

40

50

ンおよびピオグリタゾン)が市販されるのみである(Reitmann, et al.)。よって、脂肪組織萎縮症のための代替処置の必要性が存在する。

#### 【0008】

脂肪組織萎縮症のための様々な遺伝的実験動物モデルが、開発され試験された。しかしながらこれらのモデルは、レプチンによる処置に対する感受性に関して矛盾した結果を提供する。例えば、SREBP-1cの切断した核酸異形を発現し、インスリン抵抗性および著しい低脂肪組織を有する先天性の全身性リポジストロフィの特徴を呈している1つのトランスジェニックマウスモデルでは、レプチンの継続的全身投与によりインスリンに対するマウスの抵抗性が克服された(Shimomura et al., 1999)。一方、A-ZIP/F-1遺伝子を発現し、脂肪組織の欠乏、インスリンに対する重度の抵抗性、糖尿病および非常に減少した血清レプチンレベルによって特徴づけられる異なるトランスジェニックマウスでは、同等の投与量のレプチンにตอบสนองせず、より高い投与量であっても有効性は少なかった(Gavrilova et al., 2000年)。レプチンの効能はまた動物の年齢とともに減少した(前掲)。さらに、インスリン抵抗性は、SREBP-1cトランスジェニックマウスではレプチンで克服されたが、脂肪組織萎縮症の回復は観察されなかった(Shimomura et al.)。

10

#### 【0009】

ヒト治療におけるレプチンは現在、主に肥満およびそれに関連する代謝機能不全を減少することを目的に使用されている(Heymsfield et al.1999)。レプチン遺伝子中の変異によるレプチン欠損患者は、幼年期から病的に太っており、インスリン抵抗性および低ゴナドトロピン性機能低下症を含む多くのホルモン異常を有している(Montague et al.,1997)。これらの患者の1人において一年間の組換えレプチンの生理学的置換が、顕著な体重減少とホルモン異常の改善をもたらした(Farooqi et al.,1999; PCT国際出願番号: WO 00/20872)。これらの先行研究は、ヒト脂肪組織萎縮症に関連するレプチンの使用を検討していない。

20

#### 【0010】

##### (発明の概要)

本発明は、脂肪組織萎縮症およびそれに関連する代謝異常に罹患したヒトの処置におけるレプチンの使用、およびレプチン処置に対する素因を決定する方法を提供する。1つの具体例にてヒトレプチンは、レプチン血清濃度が減少している脂肪組織萎縮症患者におけるホルモン置換治療にて使用される。好適には、組換えヒトレプチンまたはレプチン類似体あるいは誘導体を使用される。レプチンタンパク質は、皮下または全身、あるいは遺伝子治療における方法を含む任意の他の経路を介して投与することができる。

30

#### 【0011】

レプチンによる処置に対する脂肪組織萎縮症患者の素因を判断するには、レプチンの血清濃度を測定すればよい。好適には4 ng/ml以下、さらに好適には2 ng/ml以下、最適には0.5 ng/ml以下の血清レプチン濃度を備えた患者が、レプチン処置を受ける状態にある。レプチンによる処置はまた、4 ng/ml未満の血清レプチン濃度の女性患者に対して、および3 ng/ml未満の血清レプチン濃度の男性患者に対して与えることが好ましい。さらに好適にはレプチンは、2 ng/ml未満の血清レプチン濃度の男性患者に対して与える。

40

#### 【0012】

##### (好ましい態様の詳細な説明)

脂肪細胞ホルモンレプチンは、エネルギー恒常性にて中心的な役割を果たす。レプチンは、置換に際して食物摂取および体重を減少させる不明であった血清因子として肥満マウスにて最初に発見された(Zhang et al., 1994; Pelleymounter et al., 1995)。これらの最初の観察のために、本ホルモンを用いる初期治療の試みの多くが肥満治療である。肥満者の多くのは血清レプチン濃度が高く、レプチン抵抗性の状態が存在していると考えられる(Mantzoros et al., 2000)。今までのところ組換えヒトレプチンの効果は、先天的レプチン欠乏症の状態の場合を除き、肥満個人に減量を起こすには限定的である(Heym

50

sfield et al., 1999; Farooqi et al., 1999)。

【0013】

本発明は、ヒトにおける脂肪組織萎縮症および、高血糖、異常脂質血症、高脂血症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、アテローム性動脈硬化症、血管再狭窄およびインスリン抵抗性のような該萎縮症に関連する代謝異常の処置のためにレプチンを使用する可能性を提供する。HIV患者における研究結果は、レプチンの血清濃度における減少が後天性脂肪組織萎縮症の発症に密接に関係していることを示している。さらに、他のすべての可能性のある治療が中止された後でさえ脂肪組織萎縮症患者におけるレプチン置換が、グルコースおよびトリグリセリド代謝を劇的に改善する。これらのレプチン置換治療のすべての場合にて、レプチンの基準血清濃度は4 ng/mlより少なかった。

10

【0014】

後天性脂肪組織萎縮症の1つの重症例では、患者(0.5 ng/ml未満の血清レプチン濃度を有する)は、重度の高トリグリセリド血症、糖尿病、有痛性発疹性皮膚黄色腫および巨大肝腫に侵されていた。4か月以上のレプチン治療が、患者の高トリグリセリド血症および高血糖症を劇的に改善し、血漿交換および他の糖尿病薬物治療を中断させた。その改善には、皮膚黄色腫の消失および患者の肝臓容量の40%の減少も伴っていた。したがってこれらのデータは、ヒトにおける後天性または先天性脂肪組織萎縮症およびそれに関連する代謝異常の処置のために、レプチン置換治療を有効に用いることができることを示す。

【0015】

さらに、これらのデータを基にして、レプチンの血清濃度が4 ng/mlより少ない患者は、レプチンによる置換治療のための患者として好適な群となるかもしれないと推定できる。レプチンレベルは、体液、最適には血液またはその何らかの部分を用いて測定できる。本明細書では、個人の血清を用いた。他の体液、例えば全血、大脳の脊髄分泌液、血漿および可能であれば尿もまた、測定可能なレプチンを含み得る。血清1 mlに対するレプチン4 ngという本発明の測定値は、他の体液中の対応するレベルと相関できる。例えば全血を用いた場合、レプチン濃度は希釈し、用いた未分画血液の希釈効果を考慮に入れる。

20

【0016】

当業者は、レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体の投与および所望の治療効果の観察によって有効投与量を確認することができる。置換治療の目標は、血漿中でのレプチンの生理学的濃度近辺を達成することである。レプチンの生理学的置換投与量は、すべての年齢の男性については約0.02 mg/kg体重/日、18歳以下の女性については約0.03 mg/kg体重/日および成人女性については約0.04 mg/kg体重/日であると推測される。レプチンの生理学的濃度近辺を達成するには、例えば、処置の最初の月には推定した置換投与量の50%、処置の第2月には置換投与量の100%、処置の第3月には置換投与量の200%により患者を処置すればよい。レプチン置換治療中には、レプチン処置の治療効果をモニターするために任意の生化学標識を測定することができる。グリコシル化ヘモグロビン(HbA<sub>1c</sub>)レベルおよびトリグリセリド(空腹時)レベルは、レプチン処置の有効性をモニターし治療効果を測定するための好適な標識である。

30

40

【0017】

別法として、以下の実施例にてさらに示したように、血清レプチンレベルは市販されている免疫測定を用いて測定することができる。一般に、血液(または血漿あるいは血清)中のレプチン量を測定するための診断分析は、最初にタンパク質の内性的レベルを決定するために用いることができる。そのような診断手段は、抗体サンドイッチ分析のような抗体分析の形式中にあるかもしれない。内性的レプチンの量をまず測定し、基準を決定する。治療投与量は、内性および外性レプチンタンパク質(すなわち自己生産または投与のどちらかの、体内にて観察されたレプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体)の定量化として決定される。患者のレプチンレベルの観察は、治療のコース期間中継続した。

【0018】

50

本発明はまた、レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体の医薬組成物の使用方法を提供する。そのような医薬組成物は、注入、または経口、肺、鼻、経皮的またはその他の投与形式の投与が可能である。レプチンタンパク質の投与の好適な方法は、皮下に体系的または遺伝子治療法によるものを含む。

#### 【0019】

一般に、本発明の医薬組成物は、製薬的に許容される希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、補形剤および/または担体と共にレプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体の効果的な量を含む。そのような組成物は、様々な緩衝液内容物の希釈剤(例えば、トリス-HCl、酢酸塩、リン酸塩)、pHおよびイオン強度の希釈剤;浄化剤および可溶化剤(例えば、トゥイーン80、ポリソルベート80)、抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、防腐剤(例えば、Thimersol、ベンジルアルコール)および充填物質(例えば、ラクトース、マンニトール)のような添加剤;ポリラクチン酸、ポリグリコール酸などのようなポリマー組成物の粒子製剤中またはリポソーム中への物質の組み込みを含む。循環血液中にて持続性持続時間の促進効果を有しうる、ハイラウロン酸もまた用いられることができる。そのような組成物は、物理的状態、安定性、インビボ放出の割合、および本タンパク質および誘導体のインビボ除去の割合に影響するかもしれない。例えば、本明細書中に参考文献として添付したレミングトンの製薬科学18版(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042))の1435~1712ページを参照のこと。組成物は、液体形式中または凍結乾燥形式のような乾燥粉末中に調製されうる。埋め込み型の持続性放出形式もまた、経皮的形式として検討されることができる。

10

20

#### 【0020】

水性環境への治療物質の分解を補助するために界面活性剤が、湿潤剤として加えられていた。界面活性剤は、ラウリル酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウムおよびスルホン酸ジオクチルナトリウムのような陰イオン浄化剤を含んでいてもよい。陽イオン浄化剤を用いることができ、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンズチオニウムを含むことが可能であった。界面活性剤としての形式に含まれる潜在的な非イオン性浄化剤の一覧は、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリオキシエチレン水素硬化ヒマシ油10、50および60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート40、60、65および80、脂肪酸エステルスクロース、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性剤は、タンパク質、または誘導体単独または異なる比率の混合物のいずれかの形式中に存在することができる。

30

#### 【0021】

レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体タンパク質の摂取を潜在的に増強する添加剤としては、例えば脂肪酸、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸がある。

#### 【0022】

制御放出形式が望ましい可能性がある。レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体タンパク質は、拡散または溶出機序のいずれかによる放出を許可する、例えば、ガムのような不活発マトリックスへの組み込みが可能であった。ゆっくり縮退するマトリックスもまた、例えば、アルギン酸、多糖のような形式に組み込むことができる。本治療の制御放出のもう一つの形式は、例えば、レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体タンパク質が、浸透効果によって水が進入しタンパク質が単一の小さな穴を通過し押し出されることを可能にする半浸透性薄膜で囲われている、オロスの治療システム(Oros therapeutic system)(Alza社)に基づく方法によるものである。いくつかの腸溶性コーティングもまた、遅延放出効果を有する。

40

#### 【0023】

さらに、レプチン、レプチン類似体またはレプチン誘導体を備えた処置に対して応答する脂肪組織萎縮症に罹患したヒト患者の素因を決定するための改良したキットを、本発明によって検討する。一つの態様では、改良したキットが、該レプチン治療前の患者のレプチンレベルが約4 ng/ml以下かどうかを決定するための手段を提供することができる。

50

関連する態様では、改良したキットが、該レプチン治療前の患者のレプチンレベルを決定する時に患者の性別を考慮することができる。よってキットは、患者が男性ならば該レプチン治療前の患者のレプチンレベルが約  $2 \text{ ng/ml}$  以下かどうか、患者が女性ならば約  $4 \text{ ng/ml}$  以下かどうかを決定するための手段を提供することができる。好適には、キットは取り扱い説明書を含む。該キットはさらに、試薬、チューブ、包装および/または他の反応組成物を含んでいてもよい。

【0024】

以下の説明は、実施例としてのみ提供され、特許請求の範囲を制限するものではなく、そのように解釈してはならない。説明に基づき、当業者は本発明の範囲を超えない好適な具体例に対する修正および変更を行ってもよい。

10

【0025】

実施例 1

以下の実施例は、HIV 関連脂肪組織萎縮症症候群 (HIV - LS) の進行が、体脂肪の蓄積、欠損または再分配に寄与する血清中の低下レプチンによって影響を受け得ることを示す。

【0026】

具体的には、本研究は、HIV - LS の脂肪組織萎縮症表現型が高活性抗レトロウイルス剤療法 (HAART) の開始に続く血清レプチンにおける変化と関連するかどうかを決定する目的で行った。本研究は、血清レプチン濃度を HAART 前および後で比較した 146 人 (146) の HIV 陽性男性を含む。身体検査により、男性を 2 つの主な表現型に評価し階層化した：それは、脂肪組織萎縮症単独、および中枢性脂肪増大を伴う脂肪組織萎縮症 (「混合型」 HIV - LS) である。

20

【0027】

146 人のうち 42 人 (42 / 146) の男性が、HAART 後、1 つ以上の身体領域中に中度または重度の脂肪組織萎縮症あるいは脂肪肥大を有することを発見した。146 人中 27 人 (27 / 146) が脂肪組織萎縮症を単独で有し、146 人中 15 人 (15 / 146) が HAART 後に「混合型」に変化した。146 人中 39 人 (39 / 146) が身体体質の変化を有せず、これらの患者を対照として利用した。一般に、HIV - LS を有する男性はより年配であり、プロチアーゼ阻害物質のより長期にわたる使用を行っていた。彼らは、より低い基準 CD4 数を有し、基準から平均 4 kg、体重が減少していた。

30

【0028】

HAART 前では脂肪組織萎縮症および「混合型」群両方の中央値基準レプチンレベルが  $3.6 \text{ ng/ml}$  であり、対照の中央値レプチンレベルが  $4.1 \text{ ng/ml}$  であった。HAART 後に脂肪組織萎縮症のみを発症した人では、血清レプチン濃度が  $3.6$  から  $2.8 \text{ ng/ml}$  (Wilcoxon  $p = 0.06$ ) に著しく減少した。他方、「混合型」 HIV - LS 群 ( $4.0 \text{ ng/ml}$ ) [ $p = \text{NS}$ ] および HIV - LS を発現しなかった 39 人の HIV 陽性対照 ( $3.7 \text{ ng/ml}$ ) [ $p = \text{NS}$ ] の両方では、血清レプチンレベルは安定なままであった。

【0029】

これらのデータは、HIV 陽性患者における高活性抗レトロウイルス剤療法に続くレプチンレベルの減少が脂肪組織萎縮症症候群の進行に寄与しうることを示唆する。

40

【0030】

実施例 2

ヒトにおける脂肪組織萎縮症を処置するためにレプチンを用いることの効果を決定するため、様々な形態の脂肪組織萎縮症と診断された 9 人の女性患者に対し、レプチン置換治療も行った。本研究の患者は、米国およびヨーロッパにて多数の内科医によって調査された。適格性として、患者には、脂肪組織萎縮症に関連する低レベル (男性にて  $3.0 \text{ ng/ml}$  未満、女性にて  $4.0 \text{ ng/ml}$  未満の血清レプチン濃度として定義する) を有すること、および以下の少なくとも 1 つの代謝異常を伴うことを要求した。：それは、(1) 米国糖尿病連合協会による糖尿病の存在 (Peters et al. 1998 参照。) ; (2) 空腹時血

50

清トリグリセリド濃度が200 mg/dLより高い；および/または(3)空腹時血清インスリン濃度が300 μU/mlより高い、である。脂肪組織萎縮症の診断は、当業者によって周知の臨床上の観点に基づいて行われた。

【0031】

表1は、本研究にて処置した患者の基準臨床特性の概要を示す。

【表1】

表1: 患者の特性

患者	年齢/性別 /タイプ	脂質降下療法	空腹時 インスリン <sup>1</sup> (μU/mL)	レプチン <sup>2</sup> (ng/mL)	RMR <sup>3</sup> (kcal/日)	総脂質 <sup>4</sup> (%)
NIH-1	17/F 後天性 全身	フェノフィブレート、アトルバスタチン、オーリスタット、週1回の血漿交換	31.2	<0.5	2010	7
NIH-2	17/F 先天性 全身	なし	334	1.0	2030	17
NIH-3	27/F 後天性 全身	なし	19	0.7	1570	18
NIH-4	17/F 先天性 全身	なし	211	1.1	2480	17
NIH-5	15/F 先天性 全身	なし	115	0.8	2670	15
NIH-6	37/F 先天性 全身	なし	25	0.6	1370	15
NIH-7	42/F 家族性 部分	ゲムフィブロジル	40.3	3.6	1980	26
UTSW-1	31/F 先天性 全身	フェノフィブレート	61.5	0.7	1702	8
UTSW-2 <sup>5</sup>	33/F 後天性 全身	ゲムフィブロジル	12.3	2.4	1497	14

10

20

30

40

【表2】

- 1 空腹時インスリン、pmol/Lにするための換算率: 7.15X (何人かの患者は、外性的インスリン治療であることに注意)
- 2 nmol/mLにするための換算率: 0/08X
- 3 安静時代謝率
- 4 測定が水中秤量技術より 7-8%高い 2 重エネルギー X 線吸収測定法を用いた測定によって得た。
- 5 非糖尿病患者

10

## 【0032】

本研究へ採用された 9 人の患者はみな女性であった。本研究は両方の性別に利用できるが、女性はより早期におよびより頻繁に認識される傾向がある。9 人の患者のうちの 5 人は、先天的な一般化された脂肪組織萎縮症または Seip-Beradinelli 症候群を有していた。本分析は、他の臨床基準 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM # 269700; Garg et al., 1992) と関連した出生からの一般化した脂肪欠損の証拠にて規定された。3 人の患者が、幼年期の明白な脂肪欠損の歴史の全身性リポジストロフィを獲得していたことが分かった。これらの患者 (UTSW - 2) の 1 人は、若年性皮膚筋炎を備えた一般化されたリポジストロフィを発現した。もう 1 人の患者 (NIH - 7) はダニガン家族性全身性リポジストロフィを有していた (OMIM # 151660; Garg, 1999; and Cao et al., 2000)

20

## 【0033】

## 研究設計

本研究は、糖尿病、消化および腎臓疾患 (NIDDK) の国立研究所の糖尿病部門、およびダラスのテキサス大学南西 (UT Southwestern) 医療センターにて、予期される非盲検研究として設計された。Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA) は、試みとして組換えメチオニルヒトレプチン (組換えレプチン) を提供した。各々の患者の応答を、各自の基準状態と比較した。脂肪組織萎縮症症候群の希少性および臨床特性の変動性のため、無作為化された偽薬処置した対照群を含むことは実現不可能であった。NIDDK およびテキサス大学南西医療センターの施設内倫理委員会は、本研究を承認した。書面による同意書は、患者または法定後見人から得られた。

30

## 【0034】

患者は、レプチン治療前およびレプチン治療の 1、2 および 4 か月後に再び国立衛生研究所の臨床センター、およびテキサス大学南西医療センターの一般臨床研究センターにて、入院患者として検討された。すべての患者は、レプチンを始める前に少なくとも 6 週間の併用薬物の安定した投与量下にあった。本研究期間にて、随時低血糖薬物を徐々に減らすか中止した。

## 【0035】

本研究の目標は、血漿中にてレプチンのほぼ生理学的な濃度を達成することであった。生理学的置換投与量が、すべての年齢の男性では  $0.02 \text{ mg/kg/day}$ 、18 歳以下の女性では  $0.03 \text{ mg/kg/day}$  および成人女性では  $0.04 \text{ mg/kg/day}$  であると推測された。組換えレプチンを、12 時間ごとに皮下に投与した。置換投与量が肥満試験の中で最も一般的に使用される投与量の約 10 分の 1 であることに注目することが重要である。患者を、第 1 月間に置換投与量の 50%、その翌月に 100% 置換投与量および次の 2 か月間に 200% 置換投与量にて処置した。組換えレプチンの効果を決定する一次終点は、ヘモグロビン A<sub>1c</sub>、および空腹時血清トリグリセリドレベルとして決定した。

40

## 【0036】

## 生物化学分析

血清グルコースおよびトリグリセリドレベルは、自動日立機器 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) およびベックマン機器 (Beckman, CA) を使用し、標準の方法によって

50

決定した。ヘモグロビン A<sub>1c</sub>は、イオン交換高圧液体クロマトグラフィー（バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社、ヘラクレス、CA）によって決定した。血清遊離脂肪酸（FFA）レベルは、業務用キット（Wako, Richmond, VA）にて決定した。血清インスリンレベルは、Abbott Imx機器（Abbott Park, IL）および業務用キット（Linco Research, Inc., St. Charles, MO）によって提供された試薬を用いた免疫分析によって決定した。血清レプチンレベルは、業務用キット（Linco Research, Inc. St. Charles, MO）を用いた免疫分析によって決定した。

#### 【0037】

##### 手順

安静時エネルギー消費は、Deltatrac設備（Sensormedics, Yorba Linda, CA）を用いて測定した。試験は、午前6時および8時の間に起きた安静時の患者にて8時間以上の一晩の断食後に行った。経口グルコース耐性試験は、75gのブドウ糖を用いた一晩の断食後に行った。血清グルコースは、グルコース負荷の-10、0、30、60、90、120および180分に測定した。

#### 【0038】

高投与量インスリン耐性試験は、インスリン感度を評価するために0.2 IU/kg調整インスリンを用いて行った。インスリンは、一晩の断食後に静脈内に投与した。グルコースのためのサンプルは、インスリン投与の-10、0、5、10、15、20および30分にて集めた。K定数（全身インスリン感度の反映としてのグルコース欠損の割合）は、第1系列動力学を用いて静脈内インスリン後の血中グルコース降下の一定割合として計算した（Harrison et al., 1976）。

#### 【0039】

身体脂肪は、二重エネルギーX線吸収測定装置を用いて決定した（DEXA, Hologic QDR 4500）（Hologic, Inc., Bedford, MA）（Lambrinoudaki et al., 1998）。肝臓のTI軸加重MR走査は、1.5テスラスキャナ上で得られた（General Electric Medical Systems, Milwaukee）（Abate et al., 1994）。肝臓容量は、サン・ワークステーション上にてMEDxイメージ分析ソフトウェアパッケージを用いて計算した（Sensor Systems, Inc., Sterling, VA）。以下のアルゴリズムの先の先端を決定することにより、肝臓の外相端の透写図を、個々の接触スライス上にて作製した。肝臓容量はその後、ピクセル領域およびスライス厚に基づいて計算した。NIH部にて参加する被験者には、推定した毎日の食物摂取を計算するために最後の3日の基準および4か月後の食物摂取を報告するように依頼した（Feskanich et al., 1993）。

#### 【0040】

##### 統計分析

測定値は平均±SEMとして示す。様々な研究期間にて研究変数を比較するため、反復手段分散分析を用いた。トリグリセリド濃度および測定したK定数のような非対称データは、対数変換した。対応のあるt検定は、適用可能な限り様々な時間ポイントと基準データを比較するために用いた。経口グルコース耐性試験期間中の血漿グルコース濃度は、繰り返された因子としてモデル化されたテスト期間での研究期間および時間の2-因子分散分析を用いて比較した。平均間の相違の95パーセントの信頼区間は、分散分析および平均間の相違に由来した（Hanh et al., 1991）。変換は、 $p < 0.05$ で統計的に有意であると考えられた。同時比較のための調節は、特別な優先仮説の統計分析のために行われなかった。

#### 【0041】

##### 結果

##### 基準患者の特性

本研究にて9人中8人は糖尿病であり、全員が高脂血症であった（表1）。すべての糖尿病患者は、本研究前に薬物療法を受け（表1、2）、4人の患者は、脂肪管理のための薬物療法を受けていた（表1）。糖尿病患者の平均HbA<sub>1c</sub>は、 $9.1 \pm 0.5\%$ （通常： $< 5.6\%$ ）であった。平均トリグリセリドレベルは、 $1405 \text{ mg/dL}$ に上がって

10

20

30

40

50

た（範囲：322～7420 mg/dL；通常範囲：35～155 mg/dL）[16 mmol/L、範囲：3.6～8.7 mmol/L]。遊離脂肪酸（FFA）レベルは、通常の上限のおよそ3倍に増加していた（ $1540 \pm 407 \mu\text{mol/L}$ ；通常：350～550  $\mu\text{mol/L}$ ）。7人のNIH患者のうち6人は、超音波での脂肪肝および物理的試験での肥大肝臓を有していた。患者のうち3人は肝臓生検を経験し、3人のうち2人は、組織病理学の基準に基づいた非アルコール性脂肪性肝炎と診断された。（Manton et al., 2000; Berasain et al., 2000; Luyckx, et al., 2000）。

#### 【0042】

平均血清レプチン濃度は基準（表1）にて  $1.3 \pm 0.3 \text{ ng/mL}$  であり、処置の第1月の月末に  $2.3 \pm 0.5 \text{ ng/mL}$ 、第2月の月末に  $5.5 \pm 1.2 \text{ ng/mL}$ 、および第4月の月末に  $11.1 \pm 2.5 \text{ ng/mL}$  までの治療で増加した。したがって、本研究にて使用した投与量の組換えレプチン投与は、これらの患者にてほぼ正常な血清レプチンレベルを与える。

10

#### 【0043】

第1の患者のレプチン効果：事例（図1）

本研究にて処置した最初の患者（NIH-1）は最も重度に罹患しており、彼女の経過は、他のすべての可能性のある治療が中止された後でさえこの集団におけるレプチン置換の劇的な効果を示すことにて示唆的である。この患者は、健康に生まれたが10および12歳の間に脂肪欠損を経験した。彼女は13歳で重度高トリグリセリド血症および14歳で糖尿病を発現した。彼女は、トリグリセリドレベルが一貫して  $10000 \text{ mg/dL}$  より高く（ $113 \text{ nmol/L}$  より高く）、9.5%のHbA<sub>1c</sub>を備えた糖尿病に罹患した15歳の時にNIH臨床センターに来院した。彼女は、散在性の有痛性発疹性皮膚黄色腫を身体および骨盤の縁まで及ぶ巨大肝腫の全体に持っていた。週間血漿交換治療およびオーリスタット（Orlistat）を、高トリグリセリド血症を軽減するために加えた（図1A）（Bolan et al）。他の顕著な臨床特徴は、大変な食欲（彼女は  $3200 \text{ kcal/日}$  を越えて食べることを報告した）および予測値の180%である  $2010 \text{ kcal/日}$  の非常に高い安静時代謝率を含んでいた。4か月以上の組換えレプチンは、血漿交換および糖尿病薬物を中止したための高トリグリセリド血症および高血糖症における著しい進歩的な改良を起こした（図1A）。代謝パラメーターにおける改善には、皮膚黄色腫の消失が伴った。さらに、彼女の肝臓容量は、（図1Bにて示される基準の  $4213 \text{ mL}$  から、4か月後の  $2644 \text{ mL}$  まで）40%減少した。

20

30

#### 【0044】

レプチンは、すべての糖尿病性脂肪組織萎縮症患者における代謝制御を改善した。レプチン治療の開始に先立って、8人の糖尿病性脂肪組織萎縮症患者は弱い代謝制御を有していた。4か月のレプチン置換治療で、HbA<sub>1c</sub>は、平均1.9パーセンテージポイント（95%CI、1.1～2.7%、 $p = 0.0012$ ）減少した（図2）。患者の個々の反応は、表3に示す。減少または中止の基準抗糖尿病治療にもかかわらず血糖制御が改善したことは特記できる（表2）。

#### 【表3】

表 2 : 本研究中の低血糖治療における変化

患者	基準期間中の低血糖治療	治療の4ヶ月での低血糖治療
NIH-1	メトホルミン (500 mg bid) アカルボース (50 mg tid)	なし
NIH-2	インスリン (800 U/日)	なし
NIH-3	インスリン (40 U/日) メトホルミン (500 mg tid)	なし
NIH-4	インスリン (1200 U/日)	なし
NIH-5	インスリン (3000 U/日)	なし
NIH-6	メトホルミン (500 mg tid)	なし
NIH-7	インスリン (200 U/day) プログリタゾン (45 mg qd)	インスリン (60 U/日)
UTSW-1	インスリン (700 U/day) インスリン	(300 U/日)
UTSW-2 非糖尿病患者	なし	なし

10

20

## 【0045】

インスリン耐性試験期間の血漿グルコースレベルは、基準と4か月の終端の比較での著しい改善を示した(図3A)。K値(グルコース消失の割合)は、全身インスリン感度の改善を示す、 $0.0071 \pm 0.0012$ から $0.0169 \pm 0.0039$ まで増加した( $p = 0.035$ )。さらに、経口グルコース耐性も基準と比較して著しく改善された(図3B)。

## 【0046】

4か月の組換えレプチン治療の終わりにて、空腹時トリグリセリドレベルは、60%に下がった(CI、43~77%、 $p < 0.001$ 、図4)。この同じ期間に、空腹時遊離脂肪酸は、 $1540 \pm 407 \mu\text{mol/L}$ から $790 \pm 164 \mu\text{mol/L}$ まで下がった( $p = 0.045$ )。個々の反応は、表3に示す。

30

## 【表4】

表 3: 治療の異なる段階中の患者の代謝パラメータ

患者	HbA <sub>1c</sub> (%)				トリグリセリド <sup>1</sup> (mg/dL)				遊離脂肪酸 <sup>2</sup> (pmol/L)			
	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
NIH-1	8.6	7.6	7.4	7.0	7420	6440	1632	1214	3977	3517	2216	1701
NIH-2 <sup>4</sup>	9.8	8.3	7.4	10.0	633	523	471	405	2922	1452	1372	1244
NIH-3	9.3	7.8	8.4	7.9	450	579	233	281	919	368	451	454
NIH-4	7.6	6.7	6.1	5.0	322	232	160	106	1838	1388	866	446
NIH-5	9.5	9.4	6.5	6.1	913	427	143	123	1066	1842	723	629
NIH-6	9.2	8.6	7.2	7.4	663	355	242	303	1672	1367	1315	428
NIH-7	9.5	8.4	7.4	6.6	802	366	295	215	384	315	306	345
UTSW-1	9.5	8.1	7.5	7.3	995	827	383	192	560	360	525	560
UTSW-2 <sup>5</sup>	5.4	4.8	5.0	5.1	447	656	276	424	520	630	1690	1310

<sup>1</sup>空腹時血漿トリグリセリドレベル、mmol/Lにするための換算率：0.1129X、通常 35-155 mg/dL

<sup>2</sup>空腹時遊離脂肪酸レベル、通常 135-550 pmol/L

<sup>3</sup>治療の月、0は基準評価期間を示す。

<sup>4</sup>本患者は、治療の第3と第4の月の間にノンコンプライアンスがあった。薬物治療の薬瓶の使用によって実証されるような完全なコンプライアンスの2ヶ月後、報告したパラメーターはそれぞれ次のとおりだった:7.3%、283mg/dL および 799 pmol/L である。

<sup>5</sup>非糖尿病患者

#### 【0047】

肝臓容量の変化、および肝機能検査法

基準平均肝臓容量は、3097 ± 391 mLであった（年齢および性別一致の正常体重の個人の比較にて約4倍上昇した）。レプチンは、基準から平均28%（CI、20～36%）肝臓容量を減少させた。肝臓容量の平均減少は、987 mL（CI、546～1428 mL、p=0.0024）であった。肝臓サイズにおける改善は、肝機能検査法における改善に関連していた。基準アラニンアミノ基転移酵素濃度は、4か月の終端にて66 ± 16 U/Lから24 ± 4 U/Lに減少した（p=0.023）。同様に、血清アスパラギン酸アミノ基転移酵素濃度は、4か月の終端にて基準および21 ± 2 U/Lで53 ± 12 U/Lであった（p=0.03）。

#### 【0048】

エネルギーバランスにおける変化

自己報告された日々の摂取カロリーは、2680 ± 250 kcal/日の基準から1600 ± 150 kcal/日に非常に減少した（p=0.005、n=7）。正確な安静時代謝率1920 ± 150 kcal/日から1580 ± 80kcal/日に並列の減少があった（p=0.003、n=9）。

#### 【0049】

1人の被験者（NIH-3）以外のすべては、4か月末にて減量していた。平均減量は、-1.7および7.3 kg間の範囲にて3.6 ± 0.9 kgであった。減量の重要な部分（50～65%）は、肝臓重量の損失に起因することができる。

#### 【0050】

耐性および副作用

10

20

30

40

50

注入部位での皮膚反応は、報告または観察されなかった。所定の生化学的または血液パラメーターでの副作用効果の傾向はなかった。患者N I H - 1は、第1投与量後に吐き気および嘔吐の発作を有していた。患者N I H - 6は、洗浄に関連する第2投与量後に高血圧症の悪化を有していた。

#### 【0051】

患者N I H - 7は、治療の第3月期間に連鎖球菌感染により入院した。これらの出来事のどれも継続的な治療にて再発しなかった。

#### 【0052】

##### 考察

本研究では、レプチン置換が、リポジストロフィおよびレプチン欠損に罹患した患者の1群にて明瞭および劇的な代謝上の利益を与えた。本研究期間にて、組換えレプチンとの置換が、H b A<sub>1c</sub>を1.9パーセントポイント改善させ、これは糖尿病人口（英国P D S、1998年）の~22%に網膜症を発現する関係リスクを減少させると推定される。さらに、トリグリセリドレベルは60%に減少し、これは母集団全体中の心臓血管事象のための相対的な危険を35~65%に減少させると推定される（Kreisberg、1998年；Garg、2000年）。

#### 【0053】

これらの結果は、レプチンの作用メカニズムに対する新規な見識を提供する。レプチンシグナルは、エネルギー恒常性の制御におけるその既知の役割に加え、全身インスリン感受性およびトリグリセリドレベルを調節していると思われる。本研究は、レプチンがヒトにてインスリン感受物質およびインスリン予備物質としてインビボで機能するという最初の証拠である。

#### 【0054】

無作為化された研究設計を用いなかったが、証拠の重要性は、改善した代謝制御が研究への参加者のコンプライアンスの改善ではなくレプチンによって引き起こされたことを示唆する。第1に、H b A<sub>1c</sub>の改善の大きさおよび再現性は、プラシーボ効果ではなく薬物結果と最も一致する。本研究に含まれた患者の不均性にもかかわらず我々は、すべての糖尿病患者における代謝制御の一定の改善を観察した。患者N I H - 2にはノンコンプライアンスの証拠があり、これは長期治療により矯正された、第2および4月の間の彼女のH b A<sub>1c</sub>の悪化から説明される（表3）。この患者における薬物中止の改善は、改善したH b A<sub>1c</sub>レベルがレプチン投与による効果である強い証拠である。

#### 【0055】

##### 食物摂取におけるレプチンの効果

脂肪組織萎縮性糖尿病におけるカロリー摂取の制限は、グルコースおよび脂質異常を改善すると認識されている（Trygstad et al., 1977）。しかしながら、患者は自らの食欲のために食事制限に従うことが困難である。レプチンは、明白にこれらの患者における食物摂取を減少させた。代謝パラメーター上の減少した食物摂取の貢献を決定するため、制限した研究を患者N I H - 1に行った。病院では、彼女は、9日間レプチンを使用中止し、カロリー摂取を使用中止前のレベルに固定した。安定したダイエット中にもかかわらず、彼女の空腹時インスリン、トリグリセリドおよびグルコース濃度は48時間以内に増加した。これらの観察は、レプチンが食物摂取に対する効果と無関係に、インスリン感受性およびトリグリセリド代謝に対して効果を有することを示す。レプチン投与ありの場合またはなしの場合の脂肪組織萎縮症マウスにおけるペア摂食実験（pair-feeding）を用いた同様のデータが報告されている（Shimomura et al., 1999；Ebihara et al., 2001）。

#### 【0056】

##### マウスモデルとの相関性

脂肪組織萎縮症の様々なマウスモデルは、脂肪組織の不存在がこの症候群におけるインスリン抵抗性の原因であることを示唆した（Burant et al., 1997；Moitra et al., 1998；Shimomura et al., 2000）。脂肪組織萎縮症マウスにて脂肪組織の移植が劇的にインスリン抵抗性を改善し、代謝制御を改善するという証明は、本仮説を強く支持する（Gavril

10

20

30

40

50

ova et al., 2000)。しかしながら、なぜ全身インスリン感受性を維持するために脂肪組織が必要なのかは、不明なままであった。上述のシモムラ (Shimomura)らと共に、前記考察した観察および結果は、全身インスリン感受性における脂肪組織の調節作用の大部分がレプチンを介して作用することを示唆する。

#### 【0057】

レプチンがインスリン感受性および脂質代謝の両方を調節する可能なメカニズムは、脂質生成を刺激する転写因子である SREBP1c に基づくかもしれない。肝臓では、SREBP1c は脂肪組織萎縮症で見られる高インスリン血症によって上方調節される。レプチン欠損および高インスリン血症は、インスリン受容体基質である IRS-2 の下方調節を引き起こし、インスリン作用を障害し、肝臓グルコース生産を増加させる。増加した脂質生成および肝臓グルコース生産は、悪循環を引き起こす。増加した組織脂質レベルは、減少した全身インスリン感受性およびさらなる肝臓グルコース生産に関連する。レプチンの置換は、この悪循環を補正することが示されている。トリグリセリド合成の割合は脂肪組織萎縮症に罹患したヒトにて研究されていないが、間接的な熱量研究は脂質生成が実際に無調節にされうるいくつかの証拠を提供する (Arioglu et al., 2000)。他の観察では、本研究にて処置した患者における安静時エネルギー消費が減少した。このことは、減少された食事誘導熱産生に帰着する、減少した食物摂取によるかもしれない。

10

#### 【0058】

レプチン:抗脂肪症ホルモン

Zuckerラットにおけるレプチン投与が、脂質蓄積部位として機能する様々な器官にて脂肪症の補正を導くことが報告された；それは、肝臓または心臓細胞の島細胞のような部位にてである (Unger, 1995; Unger et al., 1999)。脂肪細胞の外側の脂質蓄積は、トリグリセリドを貯蔵する最大容積に達した脂肪細胞に起因する現象に波及するかもしれない。リポジストロフィでは、これらの器官が脂質を貯蔵できるただ一つの部位である。リポジストロフィを備えたマウスにおけるレプチン処置は、肝臓トリグリセリド貯蔵に劇的な低下を引き起こす。並行して、リポジストロフィに罹患したヒトにおけるレプチン治療が、肝臓容積の著しく、極めて大きな減少を引き起こす。

20

#### 【0059】

レプチン置換のためのタイミング

脂肪組織が内分泌器官であるという概念は、レプチンの発見によって強く支持された。レプチンは、脳、肝臓、筋肉、脂肪および膵臓を含む代謝の主要な器官にて直接および/または間接的両方の効果がある。レプチンは確かに、唯一の循環型脂肪細胞シグナルではない。例えば、他の脂肪細胞ホルモンとしては、筋肉および肝臓にて脂肪酸化を引き起こすことにおいて重要に見える脂肪細胞特異的組成物関連タンパク質 (ACRP) 30 / アディポネクチン / AdipoQがある (Yamauchi et al., 2001; Fruebis et al., 2001; Berg et al., 2001)。脂肪細胞の欠損が、既知および未だ発見されていないすべての脂肪誘導シグナルの欠損に帰着するのであれば、従って脂肪の欠失によって特徴づけられた症候群で見られた異常の多くに寄与する。本研究は、脂肪欠損の状態における脂肪誘導ホルモンを置換する代謝効果から判断する最初のヒト研究である。脂肪組織萎縮症に関連して見られた代謝異常に対して (それだけではないが) レプチン欠損が主に貢献することが明らかとなった。そのため、本研究は、ヒトにおけるレプチン置換治療を考慮する重要な理由を強調する；それは、すなわち重度のリポジストロフィである。

30

40

#### 【0060】

実施例 III

成熟組換えメチオニルヒトレプチンのためのアミノ酸配列は、配列番号 1 として本明細書に示し、ここでマチュアなタンパク質の第 1 のアミノ酸が (部位 1 の) バリンで、メチオニル残基が部位 1 (本明細書にて rHu-レプチン 1 - 146、配列番号 1 と定義する) に位置する。

#### 【数 1】

## 数1

V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V  
 T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G  
 L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L  
 A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N  
 D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L  
 P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G  
 Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W  
 Q L D L S P G C

10

## 【0061】

別法として、以下に示した rHu - レプチン 1 - 146 と比較して部位 28 でグルタミン欠損を有する、145 アミノ酸を有するヒトレプチンの天然変異形を用いることができる（本明細書にて rHu - レプチン 1 - 145、配列番号 2 と定義し、ここで空白「\*」はアミノ酸がないことを示す）。

20

## 【数2】

## 数2

V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V  
 T R I N D I S H T \* S V S S K Q K V T G  
 L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L  
 A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N  
 D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L  
 P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G  
 Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W  
 Q L D L S P G C

30

40

## 【0062】

レプチンタンパク質、類似体、誘導體、調製、剤形化、医薬組成物、投与量および投与ルートの実施例は、以前に以下の PCT 出願にて述べており、本明細書で以下に完全に示すように本明細書に参考のために示す。PCT 国際出願番号 W0 96 / 05309 ; W0 96 / 40912 ; W0 97 / 06816 ; W0 00 / 20872 ; W0 97 / 18833 ; W0 97 / 38014 ; W0 98 / 08512 および W0 98 / 28427 である。

## 【0063】

レプチンタンパク質、類似体および関連分子もまた、以下の刊行物にて報告されている；しかしながら、報告した任意の組成物の作用に関しては説明がない。

50

米国特許番号 US5,521,283 ; US 5,525,705 ; US 5,532,336 ; US 5,552,522 ; US 5,552,523 ; US 5,552,524 ; US 5,554,727 ; US 5,559,208 ; US 5,563,243 ; US 5,563,244 ; US 5,563,245 ; US 5,567,678 ; US 5,567,803 ; US 5,569,743 ; US 5,569,744 ; US 5,574,133 ; US 5,580,954 ; US 5,594,101 ; US 5,594,104 ; US 5,605,886 ; US 5,614,379 ; US 5,691,309 ; US 5,719,266 (Eli Lilly and Company) ;  
 PCT W096 / 23513 ; W096 / 23514 ; W096 / 23515 ; W096 / 23516 ; W096 / 23517 ; W096 / 23518 ; W096 / 23519 ; W096 / 34111 ; WO 96 37517 ; W096 / 27385 ; WP 97 / 00886 ; EP 725078 ; EP 725079 ; EP 744408 ; EP 745610 ; EP 835879 (Eli Lilly and Company) ;  
 PCT W096 / 22308 (Zymogenetics) ;  
 PCT W096 / 31526 (Amylin Pharmaceuticals, Inc.)  
 PCTW096 / 34885 ; WO 97 / 46585 (SmithKline Beecham, PLC) ;  
 PCT WO 96 / 35787 (Chiron Corporation) ;  
 PCT W097 / 16550 (Bristol-Myers Squibb) ;  
 PCT WO 97 / 20933 (Schering Corporation)  
 EP 736599 (Takeda) ;  
 EP 741187 (F. Hoffman La Roche) がある。

10

## 【 0 0 6 4 】

有用なレプチンタンパク質または類似体、または関連する組成物あるいは方法、そのような組成物および/または方法のために提供するこれらの参考文献の範囲で、本方法と共に用いることが可能である。上記の条件で、これらの刊行物は本明細書に参考のために示す。

20

## 【 0 0 6 5 】

## 実施例 I V

標準酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) は、本発明の1つの実施例による脂肪組織萎縮症患者の血清中のレプチンレベルを決定するために用いることができる。E L I S A 法は、血清からのレプチンを捕らえるために精製ラットモノクローナル抗 - rmetHu - レプチン抗体を用いることができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合親和性精製ラビット抗 - rmetHu - レプチンポリクローナル抗体も捕獲したレプチンを検知するために用いられることができる。これらの抗体を用いた該分析の検知の限界は、0.5 - 0.8 ng / ml の範囲にあるかもしれない。ある抗体が使用されたかもしれないが、好ましい抗体は天然のヒトレプチンと特異的に反応し、5 ng / ml 血清以下のレプチン量を検知するために感度がよい。

30

## 【 0 0 6 6 】

好適には、患者の基準レプチンレベルを決定するためのタイミングは、午前中のような断食後8~12時間である。基準レプチンレベルは、例えば食事後など、またはほとんどの個人で観察されたレプチンの睡眠サイクル上昇(例えば、午前3時にレプチンレベルが上昇する)による、上昇レベルによって混乱されなかった。そのような基準レベルは、例えば夜間のレプチンレベル上昇の観察などに用いられてもよいが、それらのレベルは同様の状態の患者における同様のレベルと比較されるべきである。

40

## 【 0 0 6 7 】

上記のデータに基づいて、レプチンを備えた処置に対する脂肪組織萎縮症患者の素因を決定する方法は、血清レプチン濃度に対応するレプチンレベルを決定すること、および血清レプチン濃度が約4 ng / ml 以下であることにより、実行することができる。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 6 8 】

【 図 1 A 】 図 1 A は、4か月のレプチン治療を備えた患者 N I H - 1 の臨床コースを示す。レプチン治療前の史料 (0 日にて開始) は、代謝の発見事項の厳格さを証明するために示される。治療および代謝パラメーターにおける改善の重要な成果が示される。

【 図 1 B 】 図 1 B は、基準および4か月のレプチン治療で L 4 のレベルである患者 N I H - 1 の T 1 - 加重核磁気共鳴映像を示す。肝臓サイズの減少、および腎臓および正中線構

50

造の位置の必然的变化に注目すること。

【0069】

【図2】図2は、レプチンが糖尿病患者にてHbA<sub>1c</sub>を減少させることを示す(n=8)。データには、平均変化および95%信頼区間を示すエラーバーを示した。基準および4か月の±SEM値(平均標準誤差)も示した。\*p<0.001である。

【0070】

【図3】図3は、インスリン抵抗性および経口グルコース耐性の両方の期間にレプチンがグルコース曲線を改善することを示す(n=9)。パネルA：レプチン治療前(黒丸および線)および4か月後(白丸および点線)の0.2U/kgIVインスリンに対する応答での血漿グルコース。エラーバーは、SEMを示す。\*p<0.02である。パネルB：レプチン治療前(黒丸および線)および4か月後(白丸および点線)の75グラムの経口グルコースに対する応答での血漿グルコース。エラーバーは、SEMを示す。\*p<0.01である。

10

【0071】

【図4】図4は、レプチンがトリグリセリドを減少させることを示す。データには、基準からの平均変化および95%信頼区間を示すエラーバーを示した。観察した範囲の基準および4か月の平均値も示した。データが非対称であり、正規分布ではないことに注意。\*p<0.001である。

【0072】

(参考文献)

20

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Lepold L., Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-32.
2. Cosidine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334:292-5.
3. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382:250-2.
4. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387:903-8.
5. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G. et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999; 341:879-84.
6. Reitman ML, Arioglu E, Gavrilova O, Taylor SI. Lipoatrophy revisited. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11:410-6.
7. Lawrence RD. Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances: a case throwing new light on the action of insulin. *Lancet* 1946; 1:724-731 and 773-775.
8. Magre J, Delepine M, Khallouf E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 2001; 28:365-70.
9. Gavrilova O, Marcus-Samuels B; Graham D, et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 271-8.
10. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. c Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; 401:73-6.
11. Peters AL, Schriger DL. The new diagnostic criteria for diabetes : the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am J Med*

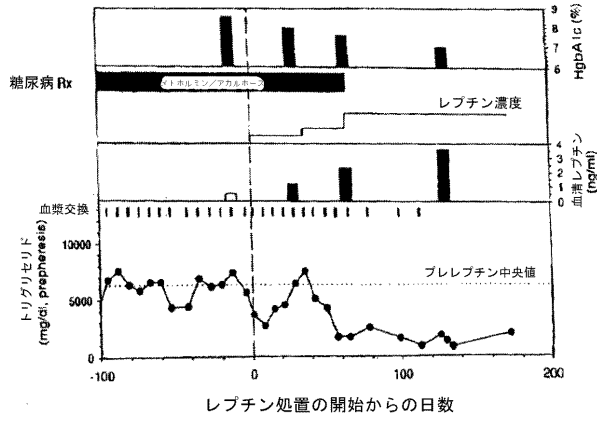
40

50

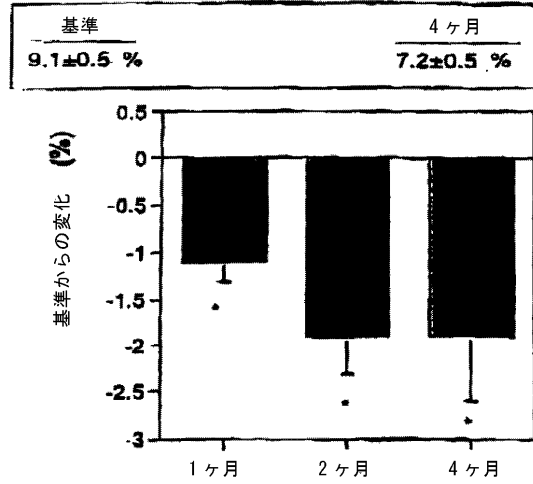
- 1998; 105:15s-19s.
12. Garg A, Fleckenstein JL, Peshock RM, Grundy SM. Peculiar distribution of adipose tissue in patients with congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:358-61.
  13. Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familiar partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:170-4.
  14. Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2000; 9:109-12. 10
  15. Harrison LC, Martin FI, Melick R4. Correlation between insulin receptor binding in isolated fat cells and insulin sensitivity in obese human subjects. *J Clin Invest* 1976; 58:1435-41.
  16. Lambrinoudaki I, Georgiou E, Douskas G, Tsekas G, Kyriakidis M, Peroukakis C. Body composition assessment by dual-energy x-ray absorptionmetry: comparison of prone and supine measurements. *Metabolism* 1998; 47:1379-82.
  17. Abate N, Bums D, Peshock RM, Garg A, Grundy SM. Estimation of adipose tissue mass by magnetic resonance imaging: validation against dissection in human cadavers. *J Lipid Res* 1994; 35:1490-6.
  18. Feskanich D, Rimm EB, Giovannucci EI, et al., Reproducibility and validity of food intake measurements from a semiquantitative food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc* 1993; 93:790-6. 20
  19. Hahn G, Meeker W. *Statistical Intervals: a guide to practitioners*. New York: John Wiley and Sons, 1991.
  20. Manton ND, Lipsett J, Moore DJ, Davidson GP, Bourne AJ, Couper RT. Non-alcoholic steatohepatitis in children and adolescents, *Med J Aust* 2000; 173:476-9.
  21. Berasain C, Betes M, Panizo A, et al. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown etiology. *Gut* 2000;47:429-35. 30
  22. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000; 26:98-106.
  23. Bolan C, Arioglu E, Gorden E, Taylor S, Lietman S. Intensive, long-term plasma exchange therapy for severe hypertriglyceridemia in acquired generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol and Metab* (submitted).
  24. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352:837-53. 40
  25. Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol* 1998; 82:67U-73U
  26. Gotto AM, Jr. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 82: 22Q25Q.
  27. Garg A., Lipodystrophies, *Am J Med* 2000; 108:143-52.
  28. Arioglu E, Duncan-Morin J, Sebring N, et al. Efficacy and safety of troglitazone in the treatment of lipodystrophy syndromes. *An Intern Med* 2000; 133:263-74.
  29. Trygstad O, Seip M, Oseid S. Lipodystrophic diabetes treated with fenfluramine. *Int J Obes* 1977; 1:287-92. 50

30. Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, et al. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes* 2001; 50:1440-8.
31. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269:546-9.
32. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269:543-6.
33. Pelleymounter MA, Cullen JM, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269:540-3. 10
34. Mantzoros CS, Flier JS. Editorial: leptin as a therapeutic agent-trials and tribulations. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4000-2.
35. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial [see comments]. *Jama* 1999; 282:1568-75.
36. Burant CF, Sreenan S, Hirano K, et al. Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest* 1997; 100:2900-8.
37. Moitra J, Mason MM, Olive M, et al. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 1998; 12: 3168-81. 20
38. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 1998; 12:3182-94.
39. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice, *Mol Cell* 2000; 6:77-86.
40. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM, Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995; 44:863-70. 30
41. Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2327-32.
42. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7:941-6.
43. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2005-10.
44. Berg AH, Cumbs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7:947-53. 40

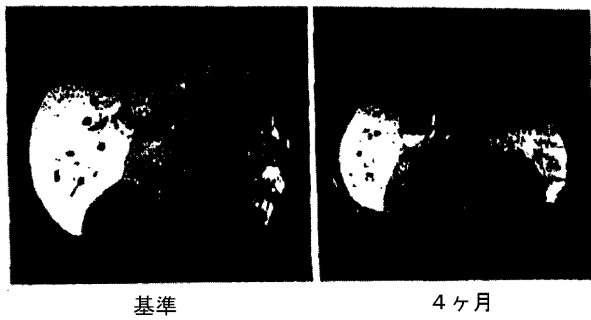
【 図 1 A 】



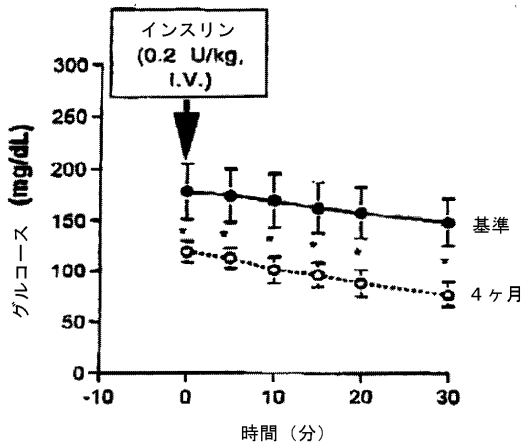
【 図 2 】



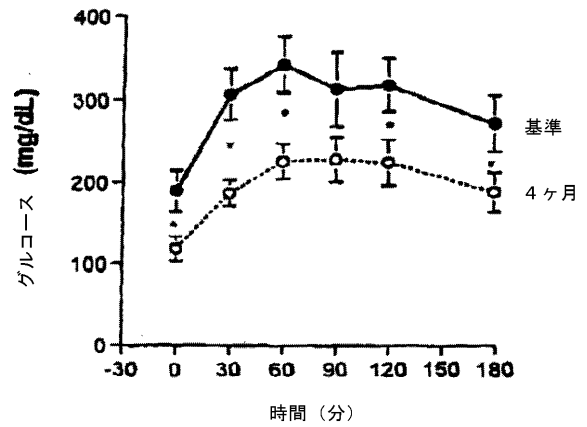
【 図 1 B 】



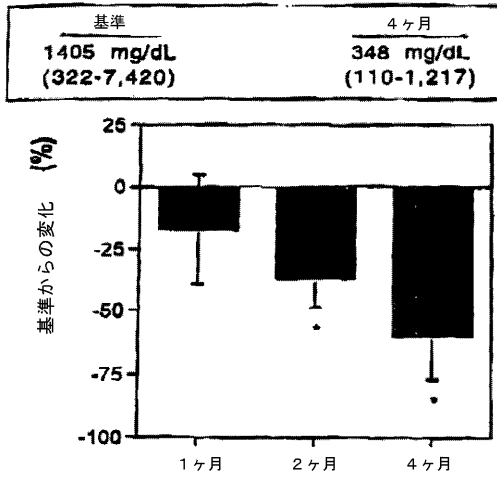
【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 4 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
1 May 2003 (01.05.2003)

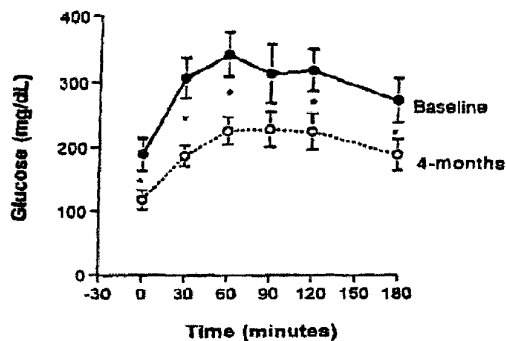
PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/034996 A2

- (51) International Patent Classification<sup>7</sup>: **A61K**
- (21) International Application Number: PCT/US02/33875
- (22) International Filing Date: 22 October 2002 (22.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/336,394 22 October 2001 (22.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **AMGEN, INC.** [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **DEFAOLI, Alex, M.** [US/US]; Amgen, Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320 (US). **ORAL, Elif, Arioglu**
- [TR/US]; National Institutes of Health, Bethesda, MD 20802 (US). **TAYLOR, Simeon, I.** [US/US]; Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US). **GARG, Abhinavny** [US/US]; University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75390 (US).
- (74) Agents: **WISE, Michael, J.** et al.; PERKINS COIE LLP, P.O. Box 1208, Seattle, WA 98111-1208 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).

[Continued on next page]

(54) Title: USE OF LEPTIN FOR TREATING HUMAN LIPOATROPHY AND METHOD OF DETERMINING PREDISPOSITION TO SAID TREATMENT



(57) Abstract: Leptin, leptin analogs, and leptin derivatives are used to treat patients with lipodystrophy. Leptin is effective against lipodystrophy conditions for both genetic and acquired forms of the disease. A therapeutically effective amount of leptin can be administered in a variety of ways, including in a vector comprising nucleic acid sequences encoding leptin. Methods of the present invention contemplate administration of leptin, leptin analogs, and leptin derivatives to patients having approximately 4 ng/ml or less before treatment.

WO 03/034996 A2

---

**WO 03/034996 A2** 

European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

**Published:**  
*without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 03/034996

PCT/US02/33875

**SPECIFICATION****USE OF LEPTIN FOR TREATING HUMAN LIPOATROPHY AND METHOD  
OF DETERMINING PREDISPOSITION TO SAID TREATMENT****GOVERNMENT INTEREST**

[0001] The present invention was supported, in part, by funding from the NIH. The government may have certain rights in the invention.

**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

[0002] The present utility application claims priority to US Provisional Application Serial No. 60/336,394 (DePaoli et al.), filed October 22, 2002, the disclosure of which is incorporated by reference in its entirety herein.

**FIELD OF THE INVENTION**

[0003] The present invention relates to the field of therapeutic use of leptin, leptin analogs, and leptin derivatives for the treatment of human lipoatrophy.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

[0004] All citations herein are incorporated in their entirety by reference. Full citations of the references can be found at the end of the detailed description.

[0005] The lipoatrophy (also known as lipodystrophy) syndromes are a heterogeneous group of syndromes characterized by a paucity of adipose or fat tissue. Metabolic abnormalities may also be associated with this condition. These metabolic abnormalities include hypertriglyceridemia and severe insulin resistance usually accompanied by diabetes mellitus (Reitmann et al., 2000). Lipoatrophy in humans may be genetically inherited or acquired. There is more than one genetic form of lipoatrophy. For example, mutations in the gene encoding lamin A/C (*LMNA*) has been shown to be associated with the Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD) (Cao et al., 2000). Individuals with Dunnigan's FPLD are born with a normal fat distribution, but at puberty, they develop progressive subcutaneous extremity and truncal fat loss, with sparing of visceral and head and neck adipose tissue. A different

WO 03/034996

PCT/US02/33875

chromosomal location (9q34) has also been linked to a disease gene for congenital generalized lipodystrophy (Garg et al., 1999). Congenital generalized lipodystrophy is a recessive disorder characterized by a near complete absence of adipose tissue from birth, insulin resistance, hypertriglyceridemia and acanthosis nigricans.

[0006] Some forms of lipodystrophy in humans are acquired. For example, many patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) and treated with highly active antiretroviral therapy (HAART) develop a partial lipodystrophy, characterized by loss of subcutaneous fat from the face, extremities and trunk, with increased visceral fat and a 'buffalo hump' similar to that seen in Cushing's syndrome. These patients may also develop metabolic disorders such as insulin resistance and hypertriglyceridemia. Acquired forms of lipodystrophy may also be associated with juvenile dermatomyositis and other autoimmune diseases.

[0007] Investigations in animal models have demonstrated that these metabolic abnormalities may be associated with fat loss (Gavrilova et al., 2000). But insulin resistance and hypertriglyceridemia that characterize lipodystrophy have been extremely refractory to treatment, even though a variety of approaches have been tried (Garg, 2000). One of these approaches includes treatment with thiazolidinediones, which are PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ ) agonists. While thiazolidinediones are appealing because they promote both adipocyte differentiation and insulin sensitivity, patients receiving thiazolidinediones are usually managed with combination therapy, including high dose insulin, oral hypoglycemic agents (e.g. metformin and thiazolidinediones), and lipid-lowering drugs, (e.g., fibrates and statins). Despite these therapies, patients with generalized lipodystrophy continue to manifest severe hypertriglyceridemia (which causes recurrent attacks of acute pancreatitis), severe hyperglycemia (which poses risk of diabetic retinopathy and nephropathy), and non-alcoholic steatohepatitis (which can result in cirrhosis) (Arioglu et al., 2000). In fact, one member of the thiazolidinediones, troglitazone, was removed from the US market because of its rare but severe hepatotoxicity, leaving two thiazolidinediones (rosiglitazone and pioglitazone) available (Reitmann, et al.). Thus, there exists a need for an alternative treatment to lipodystrophy.

[0008] A variety of genetically engineered animal models for lipodystrophy have been developed and tested. These models, however, provide conflicting results as to the sensitivity of these animals to treatment with leptin. For example, in one transgenic

WO 03/034996

PCT/US02/33875

mouse model, which expresses a truncated nuclear version of SREBP-1c and mimics the features of congenital generalized lipodystrophy having insulin resistance and markedly low adipose tissue, continuous systemic infusion of leptin overcame the resistance of the mice to insulin (Shimomura et al., 1999). On the other hand, a different transgenic mouse, which expresses the A-ZIP/F-1 gene and characterized by lack of fat tissue, severe resistance to insulin, diabetes, and greatly reduced serum leptin levels, failed to respond to leptin at similar doses and were minimally effective at higher doses (Gavrilova et al., 2000). Any efficacy with leptin also diminished with age of the animal (Id.). Furthermore, although insulin resistance was overcome with leptin in the SREBP-1c transgenic mice, reversal of lipodystrophy was not observed (Shimomura et al.).

[0009] Current use of leptin in human therapy has mainly been focused on reducing obesity and its associated metabolic dysfunction (Heymsfield et al. 1999). Patients with absence of leptin due to mutations in the leptin gene are morbidly obese from infancy and have a number of hormonal abnormalities including insulin resistance and hypogonadotropic hypogonadism (Montague et al., 1997). Physiological replacement with recombinant leptin for one year in one of these patients caused significant weight reduction and improvement in the hormonal abnormalities (Farooqi et al., 1999; PCT App. No.: WO 00/20872). These previous studies have not addressed the use of leptin in the context of human lipodystrophy.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

[0010] The present invention provides for the use of leptin in treating humans with lipodystrophy and its associated metabolic abnormalities, and provides a method of determining a predisposition to leptin treatment. In one embodiment, human leptin is used in hormone replacement therapy in lipodystrophic patients having reduced serum concentration of leptin. Preferably, recombinant human leptin or leptin analog or derivative is used. Leptin proteins may be administered subcutaneously or systemically, or through any other routes including methods in gene therapy.

[0011] In assessing the predisposition of lipodystrophic patient to treatment with leptin, serum concentration of leptin may be determined. Preferably, patients with serum leptin concentration of less than 4 ng/ml, and more preferably, less than 2 ng/ml, and most preferred, less than 0.5 ng/ml, are subjected to leptin treatment. It is also

WO 03/034996

PCT/US02/33875

preferred that treatment with leptin be given to female patients with  $< 4$  ng/ml of serum leptin concentration and to male patients with  $< 3$  ng/ml of serum leptin concentration. More preferably, leptin is given to male patients with  $< 2$  ng/ml of serum leptin concentration.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- [0012] Figure 1A shows the clinical course of patient NIH-1 with 4 months of leptin therapy. Historical data before leptin therapy (started at Day 0) is presented to demonstrate the severity of metabolic findings. Important milestones of therapy and the improvement in metabolic parameters are shown. Figure 1B depicts a T1-weighted axial magnetic resonance imaging of patient NIH-1 at the level of L4 at baseline and at 4-months of leptin therapy. Note the decrease in liver size, and the consequent changes in position of the kidneys and midline structures.
- [0013] Figure 2 shows that leptin decreases  $HbA_{1c}$  in the diabetic patients ( $n=8$ ). Data are presented as mean changes and error bars indicate 95% Confidence Interval. The baseline and 4-month value  $\pm$  SEM (standard error of the mean) are also shown. \* $p<0.001$ .
- [0014] Figure 3 shows that leptin improves the glucose curve during both insulin tolerance and oral glucose tolerance ( $n=9$ ). Panel A: Plasma glucose in response to 0.2 U/kg IV insulin before (closed circles and solid line) and 4-months after (open circles and dotted line) leptin therapy. Error bars indicate SEM \* $p<0.02$ . Panel B: Plasma glucose in response to 75-gram oral glucose before (closed circles and solid line) and 4-months after (open circles and dotted line) leptin therapy. Error bars indicate SEM. \* $p<0.01$ .
- [0015] Figure 4 shows that leptin decreases triglycerides. Data are presented as mean change from baseline and error bars represent 95% Confidence Interval. The mean baseline and 4-month values with observed ranges are also shown. Note that data are skewed and do not follow a normal distribution. \* $p<0.001$ .

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

- [0016] The adipocyte hormone leptin plays a central role in energy homeostasis. It was first discovered in the obese mouse as the missing serum factor that decreased food

WO 03/034996

PCT/US02/33875

intake and body weight upon replacement (Zhang et al., 1994; Pelleymounter et al., 1995). Because of these initial observations, much of the earlier therapeutic attempt using this hormone has been in the treatment of obesity. Serum leptin concentrations in the majority of humans with obesity are high, and a state of leptin resistance is thought to exist (Mantzoros et al., 2000). Thus far, the effect of recombinant human leptin has been limited in causing weight loss in obese individuals except in the state of congenital leptin deficiency (Heysmsfield et al., 1999; Farooqi et al., 1999).

[0017] The present invention provides for the feasibility of using leptin for the treatment of lipoatrophy and its associated metabolic abnormalities in humans such as hyperglycemia, dyslipidemia, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, atherosclerosis, vascular restenosis, and insulin resistance. Results from studies in HIV patients have shown that decrease in serum concentrations of leptin is closely associated with the onset of acquired lipoatrophy. Furthermore, leptin replacement in lipoatrophic patients dramatically improves glucose and triglyceride metabolism even after all other potential therapies have been extinguished. In all these leptin replacement therapy cases, the baseline serum concentration of leptin was less than 4 ng/ml.

[0018] In one severe case of acquired lipoatrophy, the patient (having serum leptin concentration of <0.5 ng/ml) suffered from severe hypertriglyceridemia, diabetes, painful eruptive cutaneous xanthomata, and massive hepatomegaly. Leptin treatment over four months dramatically improved the patient's hypertriglyceridemia and hyperglycemia that allowed for discontinuation of plasmapheresis and other diabetes medications. The improvements were also accompanied by disappearance of the cutaneous xanthomata and the patient's liver volume decreased by 40%. Thus, these data show that leptin replacement therapy may effectively be used to treat acquired or congenital lipoatrophy and its associate metabolic abnormalities in human.

[0019] Furthermore, based on these data, it may be extrapolated that patients with less than 4 ng/ml serum concentration for leptin may be a preferred group of patients for replacement therapy with leptin. Leptin levels may be measured using a body fluid, most preferably blood or some portion thereof. Here, serums from individuals were used. Other body fluids may also contain measurable leptin, such as whole blood, cerebral spinal fluid, plasma, and possibly urine. The present measurements of 4 ng of leptin/ml of serum may be correlated to corresponding levels in other body fluids. For

WO 03/034996

PCT/US02/33875

example, if whole blood is used, the leptin concentration will be diluted to account for the diluting effect of using unfractionated blood.

[0020] One skilled in the art will be able to ascertain effective dosages by administering leptin, leptin analog or leptin derivative and observing the desired therapeutic effect. The goal of replacement therapy is to achieve near physiological concentrations of leptin in the plasma. It is estimated that the physiological replacement dose of leptin is about 0.02 mg per kilogram of body weight per day for males of all ages, about 0.03 mg per kilogram per day for females under 18 years and about 0.04 mg per kilogram per day for adult females. When attempting to achieve near physiological concentrations of leptin, one may, for example, treat a patient with 50 percent of the estimated replacement dose for the first month of treatment, 100 percent of the replacement dose for the second month of treatment, 200 percent of the replacement dose for the third month of treatment, etc. During the course of leptin replacement therapy, one can measure certain biochemical markers to monitor therapeutic effect of the leptin treatment. Glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) levels and triglyceride (fasting) levels are among the preferred markers to measure therapeutic effect to monitor the efficacy of leptin treatment.

[0021] Alternatively, serum leptin levels can be measured using commercially available immunoassays, as further disclosed in the Examples below. In general, a diagnostic assay for measuring the amount of leptin in the blood (or plasma or serum) may first be used to determine endogenous levels of protein. Such diagnostic tools may be in the form of an antibody assay, such as an antibody sandwich assay. The amount of endogenous leptin is quantified initially, and a baseline is determined. The therapeutic dosages are determined as the quantification of endogenous and exogenous leptin protein (that is, leptin, leptin analog or leptin derivative found within the body, either self-produced or administered). Monitoring the leptin levels of a patient is continued over the course of therapy.

[0022] The present invention also provides methods of using pharmaceutical compositions of leptin, leptin analog or leptin derivative. Such pharmaceutical compositions may be for administration for injection, or for oral, pulmonary, nasal, transdermal or other forms of administration. Preferred methods of administering the leptin proteins include subcutaneously, systemically and by gene therapy methods.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

- [0023] In general, pharmaceutical compositions of the present invention comprise effective amounts of leptin, leptin analog or leptin derivative together with pharmaceutically acceptable diluents, preservatives, solubilizers, emulsifiers, adjuvants and/or carriers. Such compositions include diluents of various buffer content (*e.g.*, Tris-HCl, acetate, phosphate), pH and ionic strength; additives such as detergents and solubilizing agents (*e.g.*, Tween 80, Polysorbate 80), anti-oxidants (*e.g.*, ascorbic acid, sodium metabisulfite), preservatives (*e.g.*, Thimersol, benzyl alcohol) and bulking substances (*e.g.*, lactose, mannitol); incorporation of the material into particulate preparations of polymeric compounds such as polylactic acid, polyglycolic acid, etc. or into liposomes. Hylauronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the present proteins and derivatives. See, *e.g.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) pages 1435-1712 which are herein incorporated by reference. The compositions may be prepared in liquid form, or may be in dried powder, such as lyophilized form. Implantable sustained release formulations are also contemplated, as are transdermal formulations.
- [0024] To aid dissolution of the therapeutic into the aqueous environment a surfactant might be added as a wetting agent. Surfactants may include anionic detergents such as sodium lauryl sulfate, dioctyl sodium sulfosuccinate and dioctyl sodium sulfonate. Cationic detergents might be used and could include benzalkonium chloride or benzethonium chloride. The list of potential nonionic detergents that could be included in the formulation as surfactants are lauromacrogol 400, polyoxyl 40 stearate, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 10, 50 and 60, glycerol monostearate, polysorbate 40, 60, 65 and 80, sucrose fatty acid ester, methyl cellulose and carboxymethyl cellulose. These surfactants could be present in the formulation of the protein or derivative either alone or as a mixture in different ratios.
- [0025] Additives that potentially enhance uptake of the leptin, leptin analog or leptin derivative protein are for instance the fatty acids oleic acid, linoleic acid and linolenic acid.
- [0026] Controlled release formulation may be desirable. The leptin, leptin analog or leptin derivative protein could be incorporated into an inert matrix which permits release by either diffusion or leaching mechanisms *e.g.*, gums. Slowly degenerating

WO 03/034996

PCT/US02/33875

matrices may also be incorporated into the formulation, *e.g.*, alginates, polysaccharides. Another form of a controlled release of this therapeutic is by a method based on the Oros therapeutic system (Alza Corp.), *i.e.*, the leptin, leptin analog or leptin derivative protein is enclosed in a semi-permeable membrane, which allows water to enter and push the protein out through a single small opening due to osmotic effects. Some enteric coatings also have a delayed release effect.

[0027] Further, improved kits for determining the predisposition of a human patient with lipoatrophy to respond to treatment with leptin, leptin analog or leptin derivative are contemplated by the present invention. In one aspect, an improved kit may provide means for determining whether the leptin level of the patient prior to said leptin treatment is less than or equal to approximately 4 ng/ml. In a related aspect, an improved kit may consider the gender of a patient when determining a leptin level in the patient prior to said leptin treatment. Then, the kit may provide means for determining whether the leptin level of the patient prior to said leptin treatment is less than or equal to approximately 2 ng/ml if the patient is male, or less than or equal to approximately 4 ng/ml if the patient is female. Preferably, the kit comprises instructions for use. The kit may also comprise reagents, tubes, packaging, and/or other reaction components.

[0028] The following descriptions are provided only as examples and should not be understood to be limiting on the claims. Based on the description, a person skilled in the art may make modification and changes to the preferred embodiments, which do not depart from the scope of the invention.

#### EXAMPLE I

[0029] The following example shows that the development of HIV-associated lipoatrophy syndrome (HIV-LS) may be influenced by reduced leptin in the serum, which contributes to the accumulation, loss or redistribution of body fat.

[0030] In particular, a study was conducted for the purpose of determining whether the lipoatrophy phenotype in HIV-LS is associated with changes in serum leptin following initiation of highly active antiretroviral therapy (HAART). This study included one hundred forty six (146) HIV positive men whose serum leptin concentrations were

WO 03/034996

PCT/US02/33875

compared before and after HAART. By physical examination, the men were assessed and stratified into the two major phenotypes: lipoatrophy alone and lipoatrophy with central fat gain ("mixed" HIV-LS).

[0031] Out of the 146 men, forty-two (42/146) men were found to have moderate or severe lipoatrophy or lipohypertrophy in more than one body area following HAART. Twenty-seven of the 146 (27/146) had lipoatrophy alone and fifteen (15/146) had "mixed" changes after HAART. Thirty-nine out of the 146 (39/146) did not have body habitus changes and these patients served as controls. Generally, the men with HIV-LS were older and had longer use of protease inhibitors. They also had lower baseline CD4 counts and had lost an average of 4 kg body weight from baseline.

[0032] Before HAART, median baseline leptin levels for both the lipoatrophy and "mixed" groups were 3.6 ng/ml and median leptin level for the control was 4.1 ng/ml. In those who developed lipoatrophy alone after HAART, serum leptin concentration decreased significantly from 3.6 to 2.8 ng/ml (Wilcoxon  $p = .006$ ). On the other hand, serum leptin levels remained stable in both the "mixed" HIV-LS group (4.0 ng/ml) [ $p=NS$ ] and in the 39 HIV positive controls who did not develop HIV-LS (3.7 ng/ml) [ $p=NS$ ].

[0033] These data suggest that a reduced leptin level following the highly active antiretroviral therapy in HIV positive patients may contribute to the development of lipoatrophy syndrome.

#### EXAMPLE II

[0034] To determine the efficacy of using leptin to treat lipoatrophy in humans, leptin replacement therapy was also conducted in nine female patients who have been diagnosed with various forms of lipoatrophy. The patients of this study were referred by multiple physicians in the United States and in Europe. To be eligible, the patients were required to have low levels (defined as serum leptin concentration of  $<3.0$  ng/ml in males and  $<4.0$  ng/ml in females) in association with lipodystrophy, and at least one of the following metabolic abnormalities: (1) Presence of diabetes mellitus by American Diabetes Association criteria (See Peters et al., 1998); (2) fasting serum triglyceride concentrations  $>200$  mg/dL; and/or (3) fasting serum insulin concentrations  $>30\mu\text{U/ml}$ . The diagnosis of lipodystrophy was based on clinical grounds well known to one ordinary skilled in the art.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

[0035] Table 1 summarizes the baseline clinical characteristics of the patients treated in the study.

TABLE 1: Characteristics of Patients

Patient	Age/Sex/ Type	Lipid- Lowering Therapy	Fasting Insulin <sup>1</sup> ( $\mu$ U/mL)	Leptin <sup>2</sup> (ng/mL)	RMR <sup>3</sup> (kcal/day)	Total Fat <sup>4</sup> (%)
NIH-1	17/F Acquired Generalized	Fenofibrate Atorvastatin Orlistat, Weekly Plasmapheresis	31.2	<0.5	2010	7
NIH-2	17/F Congenital Generalized	None	334	1.0	2030	17
NIH-3	27/F Acquired Generalized	None	19	0.7	1570	18
NIH-4	17/F Congenital Generalized	None	211	1.1	2480	17
NIH-5	15/F Congenital Generalized	None	115	0.8	2670	15
NIH-6	37/F Congenital Generalized	None	25	0.6	1370	15
NIH-7	42/F Familial Partial	Gemfibrozil	40.3	3.6	1980	26
UTSW-1	31/F Congenital Generalized	Fenofibrate	61.5	0.7	1702	8
UTS W-2 <sup>5</sup>	33/F Acquired Generalized	Gemfibrozil	12.3	2.4	1497	14

<sup>1</sup> Fasting insulin, conversion factor to pmol/L: 7.15X (note that some patients are on exogenous insulin therapy)

<sup>2</sup> Conversion factor to nmol/mL: 0/08X

<sup>3</sup> Resting metabolic rate

<sup>4</sup> Obtained by measurements using dual-energy X-ray absorptiometry where the measurements are 7-8% higher than underwater weighing technique.

<sup>5</sup> Non-diabetic patient

[0036] All nine patients recruited into the study were females. Though the study was open to both genders, females tend to be recognized earlier and more frequently. Five of the nine patients had congenital generalized lipodystrophy or the Seip-Berardinelli

WO 03/034996

PCT/US02/33875

Syndrome. This diagnosis was established with evidence of generalized fat loss since birth, in association with other clinical criteria (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM #269700; Garg et al., 1992). Three patients appeared to have acquired generalized lipodystrophy with a history of apparent fat loss in childhood. One of these patients (UTSW-2) developed generalized lipodystrophy with juvenile dermatomyositis. Another patient (NIH-7) had Dunnigan's familial partial lipodystrophy (OMIM # 151660; Garg, 1999; and Cao et al., 2000).

#### Study Design

[0037] The study was designed as a prospective open-label study at the Diabetes Branch of National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), and at the University of Texas Southwestern (UT Southwestern) Medical Center at Dallas. Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA) provided recombinant methionyl human leptin (recombinant leptin) for the trial. Response of each patient was compared to her baseline state. Because of the rarity of lipodystrophy syndromes and the variability of the clinical features, it was not feasible to include a randomized placebo-treated control group. The institutional review boards of the NIDDK and University of Texas Southwestern Medical Center approved the study. Informed written consent was obtained from the patient or the legal guardian.

[0038] Patients were evaluated as in-patients at the Clinical Center of the National Institutes of Health and at the General Clinical Research Center of the University of Texas Southwestern Medical Center before treatment and again after 1, 2 and 4 months of leptin therapy. All patients were on stable doses of concomitant medications for at least 6 weeks before starting leptin. During the study, hypoglycemic drugs were tapered or discontinued as needed.

[0039] The goal in this study was to achieve near-physiological concentrations of leptin in the plasma. The physiological replacement dose was estimated to be 0.02 mg/kg/day for males of all ages, 0.03 mg/kg/day for females under 18 years and 0.04 mg/kg/day for adult females. Recombinant leptin was administered subcutaneously every 12 hours. It is important to note that the replacement dose is approximately one tenth of the dose most commonly used in obesity trials. Patients were treated with 50% of the replacement dose for the first month, 100% replacement dose the next month and 200% replacement dose for the following two months. The primary end-points to determine

WO 03/034996

PCT/US02/33875

efficacy of recombinant leptin were determined as Hemoglobin A<sub>1c</sub> and fasting serum triglyceride levels.

#### Biochemical analyses

[0040] Serum glucose and triglyceride levels were determined by standard methods using automated Hitachi equipment (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and using Beckman Instrument (Beckman, CA). Hemoglobin A<sub>1c</sub> was determined by ion-exchange high-pressure liquid chromatography (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Serum free fatty acid (FFA) levels were determined with a commercial kit (Wako, Richmond, VA). Serum insulin levels were determined by immunoassays using reagents provided by Abbott Imx Instrument (Abbott Park, IL) and a commercial kit (Linco Research, Inc., St. Charles, MO). Serum leptin levels were determined by immunoassays using a commercial kit (Linco Research, Inc. St. Charles, MO).

#### Procedures

[0041] Resting energy expenditure was measured using Deltatrac Equipment (Sensormedics, Yorba Linda, CA). The test was performed after an overnight fast for more than 8 hours in resting patients upon awakening between 6 and 8 AM. Oral glucose tolerance test was performed after an overnight fast using 75 grams of dextrose. Serum glucose was measured at -10, 0, 30, 60, 90, 120 and 180 minutes of the glucose load.

[0042] A high-dose insulin tolerance test was performed using 0.2 IU/kg regular insulin to assess insulin sensitivity. Insulin was administered intravenously after an overnight fast. Samples for glucose were collected at -10, 0, 5, 10, 15, 20 and 30 minutes of insulin administration. K constant (the rate of glucose disappearance as a reflection of total body insulin sensitivity) was calculated as the rate constant for the fall in blood glucose after intravenous insulin using first order kinetics (Harrison et al., 1976).

[0043] Body fat was determined using dual energy x-ray absorptiometer (DEXA, Hologic QDR 4500) (Hologic, Inc., Bedford, MA) (Lambrinouadaki et al., 1998). Axial T1 weighted MR scans of the liver were obtained on a 1.5 tesla scanner (General Electric Medical Systems, Milwaukee) (Abate et al., 1994). Liver volumes were calculated using the MEDx image analysis software package (Sensor Systems, Inc., Sterling, VA), on a Sun workstation. By placing a seed point for an edge following algorithm, tracings of the outer margins of the liver were made on individual

WO 03/034996

PCT/US02/33875

contiguous slices. The liver volumes were then computed based on the pixel area and slice thickness. Subjects participating at the NIH-site were asked to report their food intake in the last 3 days at baseline and at 4-months to calculate estimated daily food intake (Feskanich et al., 1993).

#### Statistical Analyses

[0044] Measurements are presented as mean  $\pm$  SEM. To compare study variables during various study periods, repeated measures analysis of variance was used. Skewed data such as the triglyceride concentrations and the calculated K constants were log-transformed. Paired t-test was employed to compare baseline data with various time points wherever applicable. Plasma glucose concentration during the oral glucose tolerance test were compared using a 2-factor analysis of variance with study period and time during the test modeled as repeated factors. Ninety-five percent confidence intervals of the differences between the means were derived from the analysis of variance and for the differences between the means (Hanh et al., 1991). Changes were considered statistically significant for  $p < 0.05$ . No adjustments for simultaneous comparisons were made for statistical analyses of specific *a priori* hypotheses.

#### Results

##### Baseline patient characteristics

[0045] Eight of nine patients in the study were diabetic and all were hyperlipidemic (Table 1). All diabetic patients received pharmacotherapy prior to the study (Table 1 and 2) and 4 patients received pharmacotherapy for lipid management (Table 1). The average HbA<sub>1c</sub> of the diabetic patients was  $9.1 \pm 0.5\%$  (normal:  $< 5.6\%$ ). The mean triglyceride levels were elevated at 1405 mg/dL (range: 322-7,420 mg/dL; normal range: 35-155 mg/dL) [16 mmol/L, range: 3.6-8.7 mmol/L]. Free fatty acid (FFA) levels were increased about 3-fold from the upper limit of normal ( $1540 \pm 407 \mu\text{mol/L}$ ; normal: 350-550  $\mu\text{mol/L}$ ). Six of the seven NIH patients had fatty liver on ultrasound and enlarged livers on physical exam. Three of the patients underwent liver biopsies and two of the three were diagnosed with non-alcoholic steatohepatitis based on histopathological criteria (Manton et al., 2000; Berasain et al., 2000; Luyckx, et al., 2000).

WO 03/034996

PCT/US02/33875

[0048] The mean serum leptin concentration was  $1.3 \pm 0.3$  ng/mL at baseline (Table 1) which increased with therapy to  $2.3 \pm 0.5$  ng/mL at the end of the first month,  $5.5 \pm 1.2$  ng/mL at the end of the second month, and  $11.1 \pm 2.5$  ng/mL at the end of the fourth month. Therefore, recombinant leptin administration at the doses used in this study resulted in approximately normal serum leptin levels in these patients.

Effect of leptin on the first patient: a case example (Fig. 1)

[0047] The first patient treated in the study (NIH-1) is the most severely affected and her course is instructive in showing the dramatic effect of leptin replacement in this population even after all other potential therapies have been extinguished. This patient was born healthy, but experienced fat loss between age 10 and 12. She developed severe hypertriglyceridemia at age 13 and diabetes at age 14. She was presented to the NIH Clinical Center at age 15 with triglyceride levels consistently  $>10,000$  mg/dL ( $>113$  nmol/L) and diabetes with HbA<sub>1c</sub> of 9.5%. She had painful eruptive cutaneous xanthomata scattered throughout the body and massive hepatomegaly extending to the pelvic brim. Weekly plasmapheresis therapy and Orlistat were added to alleviate hypertriglyceridemia (Figure 1A) (Bolan et al.). Other remarkable clinical features included a voracious appetite (she reported eating in excess of 3200 kcal/day) and a greatly elevated resting metabolic rate at 2010 kcal/day, 180% of predicted. Over a four-month period, recombinant leptin caused a marked progressive improvement in hypertriglyceridemia and hyperglycemia that allowed for discontinuation of plasmapheresis and diabetes medications (Figure 1A). The improvements in metabolic parameters were accompanied by disappearance of cutaneous xanthomata. In addition, her liver volume decreased by 40% (from 4213 mL at baseline to 2644 mL at 4 months, shown in Figure 1B).

Leptin improved metabolic control in all diabetic lipotrophic patients

[0048] Prior to the initiation of leptin therapy, the eight diabetic lipotrophic patients had poor metabolic control. With four months of leptin replacement therapy, HbA<sub>1c</sub> decreased by a mean of 1.9 percentage points (95% CI, 1.1 to 2.7 %,  $p=0.0012$ ) (Fig. 2). Individual responses of patients are shown in Table 3. It is notable that glycemic control improved despite decreasing or discontinuing baseline anti-diabetes therapy (Table 2).

WO 03/034996

PCT/US02/33875

Table 2: Changes in hypoglycemic therapy during the study

Patient	Hypoglycemic therapy during baseline period	Hypoglycemic therapy at 4-months of therapy
NIH-1	Metformin (500 mg bid) Acarbose (50 mg tid)	None
NIH-2	Insulin (800 U/day)	None
NIH-3	Insulin (40 U/day) Metformin (500 mg tid)	None
NIH-4	Insulin (1200 U/day)	None
NIH-5	Insulin (3000 U/day)	None
NIH-6	Metaformin (500 mg tid)	None
NIH-7	Insulin (200 U/day) Proglitazone (45 mg qd)	Insulin (60 U/day)
UTSW-1	Insulin (700 U/day) Insulin	(300 U/day)
UTSW-2 Nondiabetic patient	None	None

[0049] The plasma glucose levels during the insulin tolerance test showed significant improvement at the end of 4 months compared to the baseline (Fig. 3A). The K-value (rate of glucose disappearance) increased from  $0.0071 \pm 0.0012$  to  $0.0169 \pm 0.0039$  indicating improvement of whole-body insulin sensitivity ( $p=0.035$ ). Further, the oral glucose tolerance was also significantly improved compared to baseline (Figure 3B).

[0050] At the end of four months of recombinant leptin therapy, the fasting triglyceride levels fell by 60% (CI, 43 to 77%,  $p<0.001$ , Fig. 4). During this same period, fasting free fatty acids fell from  $1540 \pm 407 \mu\text{mol/L}$  to  $790 \pm 164 \mu\text{mol/L}$  ( $p=0.045$ ). Individual responses are shown in Table 3.

Table 3: Patients' metabolic parameters during different stages of therapy

Patients	HbA <sub>1c</sub> <sup>1</sup> (%)				Triglycerides <sup>1</sup> (mg/dL)				Free fatty acids <sup>2</sup> (pmol/L)			
	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
NIH-1	8.6	7.6	7.4	7.0	7420	6440	1632	1214	3977	3517	2216	1701
NIH-2 <sup>1</sup>	9.8	8.3	7.4	10.0	633	523	471	405	2922	1452	1372	1244
NIH-3	9.3	7.8	8.4	7.9	450	579	233	281	919	368	451	454
NIH-4	7.6	6.7	6.1	5.0	322	232	160	106	1838	1388	866	446
NIH-5	9.5	9.4	6.5	6.1	913	427	143	123	1066	1842	723	629
NIH-6	9.2	8.6	7.2	7.4	663	355	242	303	1672	1367	1315	428
NIH-7	9.5	8.4	7.4	6.6	802	366	295	215	384	315	306	345
UTSW-1	9.5	8.1	7.5	7.3	995	827	383	192	560	360	525	360
UTSW-2 <sup>1</sup>	5.4	4.8	5.0	5.1	447	656	276	424	520	630	1690	1310

WO 03/034996

PCT/US02/33875

<sup>1</sup>Fasting plasma triglyceride levels, conversion factor to mmol/L: 0.1129X, normal 35-155 mg/dL

<sup>2</sup>Fasting free fatty acid levels, normal 135-550 pmol/L

<sup>3</sup>Month of therapy, 0 refers to baseline evaluation period

<sup>4</sup>This patient had noncompliance between 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> months of therapy. After two months of strict compliance as documented by vials of medication used, the reported parameters were respectively: 7.3%, 283 mg/dL and 799 pmol/L

<sup>5</sup>Non-diabetic patient

#### Changes in liver volume, and liver function tests

[0051] Baseline mean liver volume was 3097±391 mL (about 4-fold elevated compared to age and sex-matched normal weight individuals). Leptin decreased the liver volume by an average of 28% (CI, 20 to 36%) from baseline. The mean decrease in liver volume was 987 mL (CI, 546 to 1428 mL, p=0.0024). The improvement in liver size was associated with improvement in liver function tests. Baseline alanine-transaminase concentrations decreased from 66±16 U/L to 24±4 U/L at the end of 4 months (p=0.023). Likewise, serum aspartic-transaminase concentrations were 53±12 U/L at baseline and 21±2 U/L at the end of 4-months (p=0.03).

#### Changes in energy balance

[0052] Self-reported daily caloric intake was greatly reduced from a baseline of 2680±250 kcal/day to 1600±150 kcal/day (p=0.005, n=7). There was a parallel decrease in the measured resting metabolic rate 1920±150 kcal/day to 1580±80 kcal/day (p=0.003, n=9).

[0053] All but one (NIH-3) subject had weight loss at the end of 4 months. The mean weight loss was 3.6±0.9 kg with a range between -1.7 and 7.3 kg. An important fraction of weight loss (50-65%) can be attributed to loss of liver weight.

#### Tolerability and adverse events

[0054] No skin reactions at injection sites were reported or observed. There were no trends towards adverse effects on routine biochemical or hematological parameters. Patients NIH-1 had a severe episode of nausea and vomiting after the first dose. Patient NIH-6 had exacerbation of hypertension after the second dose associated with flushing.

[0055] Patient NIH-7 was hospitalized due to streptococcus infection during the third month of therapy. None of these events recurred with continued therapy.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

Discussion

[0056] In this study, leptin replacement led to clear and dramatic metabolic benefits in a group of patients with lipodystrophy and leptin deficiency. During the study, replacement with recombinant leptin resulted in 1.9 percentage point improvement in HbA<sub>1c</sub>, which is predicted to decrease the relative risks to develop retinopathy by ~22% in the diabetic population (UK PDS, 1998). Furthermore, triglyceride levels fell by 60%, which is predicted to decrease the relative risk for cardiovascular events in the general population by 35-65% (Kreisberg, 1998; Garg, 2000).

[0057] These results provide a novel insight into the mechanisms of action of leptin. Leptin signal appears to regulate total body insulin sensitivity and triglyceride levels in addition to its known role in the control of energy homeostasis. This study is the first evidence that leptin functions as an insulin-sensitizing and insulin-sparing agent *in vivo* in humans.

[0058] Although a randomized study design was not employed, the weight of evidence suggests that the improved metabolic control was caused by leptin rather than improved compliance associated with participation in a study. First, the magnitude and reproducibility of the improvement of HbA<sub>1c</sub> are most consistent with a drug effect rather than a placebo effect. Despite the heterogeneity of the patients included in our study, we observed a uniform improvement in metabolic control in all the diabetic patients. There was evidence of noncompliance in patient NIH-2, explaining the worsening of her HbA<sub>1c</sub> between 2 and 4 months that was corrected with prolonged therapy (Table 3). This patient-improved drug withdrawal is strong evidence that the effect on improved HbA<sub>1c</sub> levels is due to leptin administration.

Effect of leptin on food intake

[0059] It is recognized that limiting caloric intake in lipotrophic diabetes improves glucose and lipid abnormalities (Trygstad et al., 1977). However, patients have difficulty complying with meal limitations due to their appetite. Leptin clearly reduced food intake in these patients. A limited study was carried out with Patient NIH-1 to determine the contribution of decreased food intake on the metabolic parameters. In the hospital, she underwent 9 days of leptin withdrawal with caloric intake clamped at pre-withdrawal levels. Despite being on a steady diet, her fasting insulin, triglyceride and glucose concentrations increased within 48 hours. These observations indicate that

WO 03/034996

PCT/US02/33875

leptin has effects on insulin sensitivity and triglyceride metabolism independent of its effects on food intake. Similar data using pair-feeding experiments in lipoatrophic mice with or without leptin administration have been reported (Shimomura et al., 1999; Ebihara et al., 2001).

#### Correlation with mouse models

[0060] The various mouse models of lipoatrophy suggested that the absence of adipose tissue is the cause of insulin resistance in this syndrome (Burant et al., 1997; Moitra et al., 1998; Shimomura et al., 2000). The demonstration that transplantation of adipose tissue into lipoatrophic mice dramatically ameliorates insulin resistance and improves metabolic control provides strong support for this hypothesis (Gavrilova et al., 2000). However, it remained unclear why adipose tissue was required to maintain whole body insulin sensitivity. The observations and the results discussed above, together with Shimomura *et al supra*, suggest that the majority of the regulatory action of adipose tissue on whole body insulin sensitivity act through leptin.

[0061] Possible mechanism of how leptin regulates both insulin sensitivity and lipid metabolism may be based on SREBP1c, a transcription factor stimulating lipogenesis. In the liver, SREBP1c is upregulated by hyperinsulinemia seen in lipoatrophy. Leptin deficiency and hyperinsulinemia cause down-regulation of insulin-receptor substrate, IRS-2, impairing insulin action and increasing hepatic glucose output. The increased lipogenesis and hepatic glucose output create a vicious cycle. Increased tissue lipid levels are associated with decreased whole body insulin sensitivity and thus more hepatic glucose output. Replacement of leptin is shown to correct this vicious cycle. While the rate of triglyceride synthesis was not studied in humans with lipoatrophy, the indirect calorimetric studies provide some evidence that lipogenesis may in fact be dysregulated (Arioglu et al., 2000). Another observation was the decline in resting energy expenditure in the patients treated in this study. This may be due to decreased food intake resulting in reduced diet-induced thermogenesis.

#### Leptin: an anti-steatosis hormone

[0062] It has been reported that leptin administration in Zucker rats leads to correction of steatosis in a variety of organs that act as lipid accumulation sites; such as the islet cells of the liver or heart cells (Unger, 1995; Unger et al., 1999). The lipid accumulation outside of the adipocytes may be a spill over phenomenon resulting from

WO 03/034996

PCT/US02/33875

the adipocytes having reached maximum capacity to store triglycerides. In lipodystrophy, these organs are the only sites that can store lipids. Leptin treatment in mice with lipodystrophy causes a dramatic fall in hepatic triglyceride stores. In parallel, leptin therapy in humans with lipodystrophy causes a remarkable, highly significant reduction in liver volumes.

#### Timing for Leptin replacement

[0063] The concept that adipose tissue is an endocrine organ was strongly supported by the discovery of leptin. Leptin has effects, both direct and/or indirect, on the key organs of metabolism, including the brain, liver, muscle, fat and pancreas. Leptin certainly is not the only circulating adipocyte signal. For example, another adipocyte hormone is adipocyte specific complement related protein (ACRP) 30/Adiponectin/AdipoQ which seems to be important in inducing fat oxidation in the muscle and liver (Yamauchi et al., 2001; Fruebis et al., 2001; Berg et al., 2001). Lack of adipocytes should result in deficiency of all fat-derived signals known and yet to be discovered, thus contributing to many of the abnormalities seen in syndromes characterized by absence of fat. This study is the first human study looking at the metabolic efficacy of replacing a fat-derived hormone in a state of fat deficiency. It appears that leptin deficiency is the major contributor (but probably not the only one) to the metabolic abnormalities seen in association with lipodystrophy. As such, this study underscores an important reason to consider leptin replacement therapy in humans; namely severe lipodystrophy.

#### EXAMPLE III

[0064] The amino acid sequence for mature, recombinant methionyl human leptin is presented herein as SEQ ID NO. 1, where the first amino acid of the mature protein is valine (at position 1) and a methionyl residue is located at position -1 (herein called rHu-Leptin 1-146, SEQ ID No. 1).

V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V  
 T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G  
 L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L  
 A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N

WO 03/034996

PCT/US02/33875

D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L  
P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G  
Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W  
Q L D L S P G C

[0065] Alternatively, one may use a natural variant of human leptin, which has 145 amino acids, and, as compared to rHu-Leptin 1-146, has a glutamine absent at position 28, presented below (herein called rHu-Leptin 1-145, SEQ ID NO. 2, wherein the blank ("\*\*") indicates no amino acid).

V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V  
T R I N D I S H T \* S V S S K Q K V T G  
L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L  
A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N  
D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L  
P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G  
Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W  
Q L D L S P G C

[0066] Other examples of leptin proteins, analogs, derivatives, preparations, formulations, pharmaceutical composition, doses, and administration routes have previously been described in the following PCT Applications and are hereby incorporated by reference as if fully set forth herein. PCT International Publication Number WO 96/05309; WO 96/40912; WO 97/06816; WO 00/20872; WO 97/18833; WO 97/38014; WO 98/08512 and WO 98/28427.

[0067] Leptin proteins, analogs and related molecules are also reported in the following publications; however, no representation is made with regard to the activity of any composition reported.

[0068] U.S. Patent Nos. 5,521,283; 5,525,705; 5,532,336; 5,552,522; 5,552,523; 5,552,524; 5,554,727; 5,559,208; 5,563,243; 5,563,244; 5,563,245; 5,567,678; 5,567,803; 5,569,743; 5,569,744; 5,574,133; 5,580,954; 5,594,101; 5,594,104; 5,605,886; 5,614,379; 5,691,309; 5,719,266 (Eli Lilly and Company);

WO 03/034996

PCT/US02/33875

- [0069] PCT WO96/23513; WO96/23514; WO96/23515; WO96/23516; WO96/23517; WO96/23518; WO96/23519; WO96/34111; WO 96 37517; WO96/27385; WP 97/00886; EP 725078; EP 725079; EP 744408; EP 745610; EP 835879 (Eli Lilly and Company);
- [0070] PCT WO96/22308 (Zymogenetics);
- [0071] PCT WO96/31526 (Amylin Pharmaceuticals, Inc.)
- [0072] PCTWO96/34885; WO 97/46585 (SmithKline Beecham, PLC);
- [0073] PCT WO 96/35787 (Chiron Corporation);
- [0074] PCT WO97/16550 (Bristol-Myers Squibb);
- [0075] PCT WO 97/20933 (Schering Corporation)
- [0076] EP 736599 (Takeda);
- [0077] EP 741187 (F. Hoffman La Roche).
- [0078] To the extent these references provide for useful leptin proteins or analogs, or associated compositions or methods, such compositions and/or methods may be used in conjunction with the present methods. With the above provisos, these publications are herein incorporated by reference.

#### EXAMPLE IV

- [0079] A standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) may be used to determine leptin levels in the serum of lipoatrophic patients according to one embodiment of the present invention. The ELISA method may use a purified rat monoclonal anti-rmethHu-Leptin antibody for capturing leptin from serum. Affinity purified rabbit anti-rmethHu-leptin polyclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase may also be used to detect captured leptin. The limit of detection of the said assay using these antibodies may be in the range of 0.5-0.8 ng/ml. Although certain antibodies may have been used, preferred antibodies are those which specifically react with native human leptin, and are sensitive to detect leptin quantities of equal to or below 5 ng/ml serum.
- [0080] Preferably, the timing for determining the baseline leptin levels in a patient is after an 8-12 hour fast such as during morning hours. Baseline leptin levels may not be confounded by raising levels, such as after a meal, or due to sleep cycle rise in leptin seen in most individuals (e.g., 3:00 a.m. rise in leptin levels). Such baseline levels may

WO 03/034996

PCT/US02/33875

be used, such as observation of nocturnal elevation of leptin levels, but those levels should be compared against similar levels in similarly situated patients.

[0081] Based on the above data, a method of determining predisposition of lipotrophic patients to treatment with leptin can be performed by determining the leptin level corresponding to the serum leptin concentration and ascertaining that the serum leptin concentration is about 4 ng/ml or less.

## REFERENCES CITED

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Lepold L., Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-32.
2. Cosidine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334:292-5.
3. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382:250-2.
4. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387:903-8.
5. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G. et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999; 341:879-84.
6. Reitman ML, Arioglu E, Gavrilova O, Taylor SI. Lipoatrophy revisited. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11:410-6.
7. Lawrence RD. Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances: a case throwing new light on the action of insulin. *Lancet* 1946; 1:724-731 and 773-775.
8. Magre J, Delepine M, Khalouf E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 2001; 28:365-70.
9. Gavrilova O, Marcus-Samuels B; Graham D, et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 271-8.
10. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. c Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; 401:73-6.
11. Peters AL, Schriger DL. The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am J Med* 1998; 105:15s-19s.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

12. Garg A, Fleckenstein JL, Peshock RM, Grundy SM. Peculiar distribution of adipose tissue in patients with congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:358-61.
13. Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familiar partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:170-4.
14. Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2000; 9:109-12.
15. Harrison LC, Martin FI, Melick R4. Correlation between insulin receptor binding in isolated fat cells and insulin sensitivity in obese human subjects. *J Clin Invest* 1976; 58:1435-41.
16. Lambrinouadaki I, Georgiou E, Douskas G, Tsekas G, Kyriakidis M, Prouktakis C. Body composition assessment by dual-energy x-ray absorptiometry: comparison of prone and supine measurements. *Metabolism* 1998; 47:1379-82.
17. Abate N, Bums D, Peshock RM, Garg A, Grundy SM. Estimation of adipose tissue mass by magnetic resonance imaging: validation against dissection in human cadavers. *J Lipid Res* 1994; 35:1490-6.
18. Feskanih D, Rimm EB, Giovannucci EI, et al., Reproducibility and validity of food intake measurements from a semiquantitative food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc* 1993; 93:790-6.
19. Hahn G, Meeker W. *Statistical Intervals: a guide to practitioners*. New York: John Wiley and Sons, 1991.
20. Manton ND, Lipsett J, Moore DJ, Davidson GP, Bourne AJ, Couper RT. Non-alcoholic steatohepatitis in children and adolescents. *Med J Aust* 2000; 173:476-9.
21. Berasain C, Betes M, Panizo A, et al. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown etiology. *Gut* 2000; 47:429-35.
22. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000; 26:98-106.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

23. Bolan C, Arioglu E, Gorden E, Taylor S, Lietman S. Intensive, long-term plasma exchange therapy for severe hypertriglyceridemia in acquired generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* (submitted).
24. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352:837-53.
25. Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol* 1998; 82:67U-73U
26. Gotto AM, Jr. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 82: 22Q25Q.
27. Garg A., Lipodystrophies, *Am J Med* 2000; 108:143-52.
28. Arioglu E, Duncan-Morin J, Sebring N, et al. Efficacy and safety of troglitazone in the treatment of lipodystrophy syndromes. *An Intern Med* 2000; 133:263-74.
29. Trygstad O, Seip M, Oseid S. Lipodystrophic diabetes treated with fenfluramine. *Int J Obes* 1977; 1:287-92.
30. Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, et al. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipodystrophic diabetes. *Diabetes* 2001; 50:1440-8.
31. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269:546-9.
32. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269:543-6.
33. Pelleymounter MA, Cullen JM, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269:540-3.
34. Mantzoros CS, Flier JS. Editorial: leptin as a therapeutic agent-trials and tribulations. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4000-2.
35. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial [see comments]. *Jama* 1999; 282:1568-75.
36. Burant CF, Sreenan S, Hirano K, et al. Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest* 1997; 100:2900-8.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

37. Moitra J, Mason MM, Olive M, et al. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 1998; 12: 3168-81.
38. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 1998; 12:3182-94.
39. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 2000; 6:77-86.
40. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM, Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995; 44:863-70.
41. Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2327-32.
42. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7:941-6.
43. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:2005-10.
44. Berg AH, Cumbs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7:947-53.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

**CLAIMS**

We claim:

1. A method of determining a predisposition of a lipotrophic patient to respond to treatment with leptin, leptin analog, or leptin derivative, the method comprising:  
(a) determining a leptin level in the patient prior to said treatment; and  
(b) ascertaining whether the leptin level is less than or equal to approximately 4 ng/ml.
2. The method of claim 1, wherein said patient is a male and said leptin level is less than or equal to approximately 2 ng/ml prior to treatment.
3. The method of claim 1, wherein said patient is a female.
4. A method of determining a predisposition of a lipotrophic patient to respond to treatment with leptin, leptin analog, or leptin derivative, the method comprising:  
(a) determining a leptin level in the patient prior to said treatment; and  
(b) ascertaining whether the leptin level of (i) a male patient is less than or equal to approximately 2 ng/ml, or (ii) a female patient is less than or equal to approximately 4 ng/ml.
5. The method of any of claims 1-4, wherein said leptin level is determined by an antibody immunoassay.
6. A method for treating lipoatrophy, comprising a pharmaceutical regimen comprising a combination of protease inhibitor and leptin, leptin analog, or leptin derivative.
7. A method for treating lipoatrophy, comprising a pharmaceutical regimen comprising a combination of leptin, leptin analog, or leptin derivative and at least one compound selected from the group consisting of thiazolidinediones, fibrates, statins and metformin.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

8. A method of treating a human with metabolic abnormalities associated with lipoatrophy, comprising administering leptin, leptin analog, or leptin derivative.
9. A method of treating a human patient with a condition of lipoatrophy, wherein said lipoatrophy is an acquired form of the disease, which comprises administering to the patient an effective dose of leptin, leptin analog or leptin derivative.
10. The method of claim 10, wherein the acquired form of lipoatrophy is related to treating the HIV positive patient with highly active antiretroviral therapy (HAART).
11. An improved kit for determining the predisposition of a human patient with lipoatrophy to respond to treatment with leptin, leptin analog or leptin derivative, the improvement comprising means for determining whether the leptin level of the patient prior to said leptin treatment is:
- (i) less than or equal to approximately 2 ng/ml if said patient is male, or
  - (ii) less than or equal to approximately 4 ng/ml if said patient is female.

WO 03/034996

PCT/US02/33875

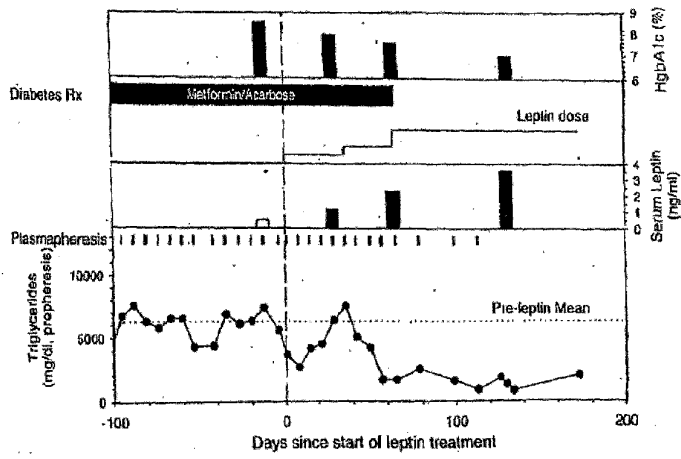


FIGURE 1A

WO 03/034996

PCT/US02/33875

**FIGURE 1B**

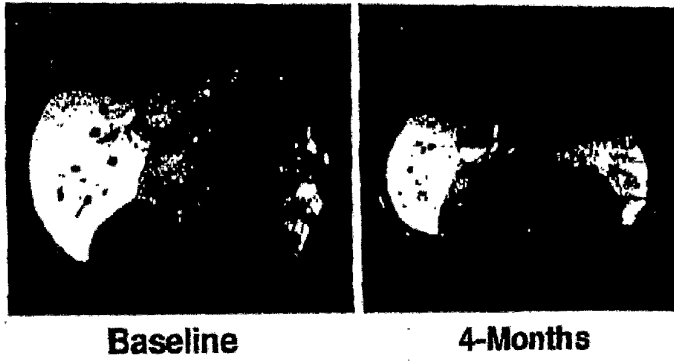
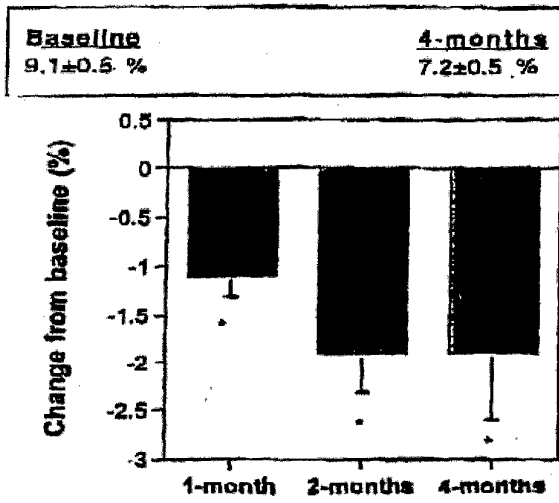


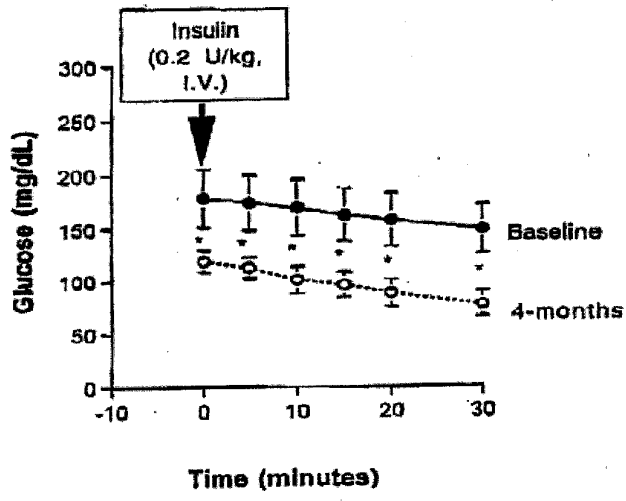
FIGURE 2



WO 03/034996

PCT/US02/33875

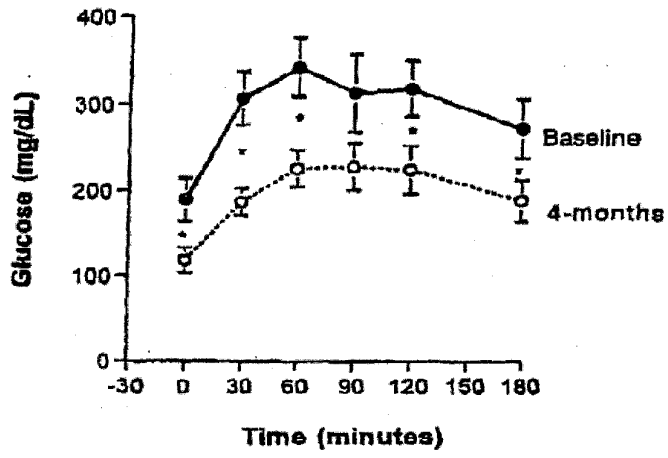
FIGURE 3A



WO 03/034996

PCT/US02/33875

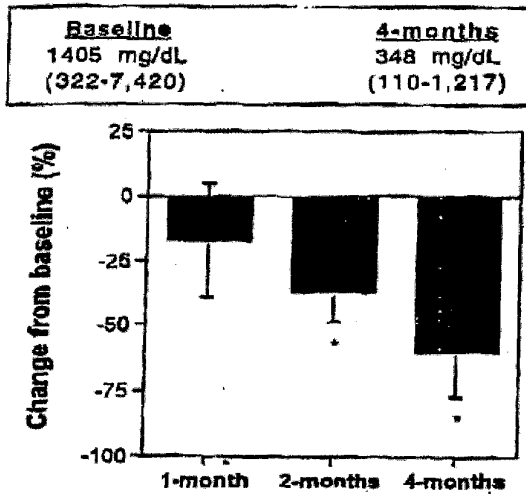
FIGURE 3B



WO 03/034996

PCT/US02/33875

FIGURE 4



WO 03/034996

PCT/US02/33875

## SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN, INC.  
 <120> USE OF LEPTIN FOR TREATING HUMAN LIPOATROPHY AND METHOD  
 OF DETERMINING PREDISPOSITION TO SAID TREATMENT  
 <130> 54113.8005.W000  
 <140> not yet assigned  
 <141> 2002-10-22  
 <150> US 60/336,394  
 <151> 2001-10-22  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Recombinant Leptin Human 146 (rHu-Leptin 1-146)  
 <400> 1  
 Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser  
 20 25 30  
 Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile  
 35 40 45  
 Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile  
 50 55 60  
 Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys  
 85 90 95  
 His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg  
 115 120 125  
 Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro  
 130 135 140  
 Gly Cys  
 145

WO 03/034996

PCT/US02/33875

<210> 2  
 <211> 145  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Recombinant Leptin Human 145 (rHu-Leptin 1-145)  
  
 <400> 2  
 Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Ser Val Ser Ser Lys  
 20 25 30  
 Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu  
 35 40 45  
 Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile Leu  
 50 55 60  
 Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His  
 85 90 95  
 Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val  
 100 105 110  
 Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu  
 115 120 125  
 Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro Gly  
 130 135 140  
  
 Cys  
 145

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/034996 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, A61K 38/16, 38/19
- (21) International Application Number: PCT/US02/33875
- (22) International Filing Date: 22 October 2002 (22.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/336,394 22 October 2001 (22.10.2001) US
- (71) Applicant for all designated States except US: AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): DEPAOLI, Alex, M. [US/US]; Amgen, Inc., One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320 (US). ORAL, Ehf, Arioglu [TR/US]; National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892 (US). TAYLOR, Simeon, I. [US/US]; Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US). GARG, Abhinavnyu [US/US]; University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75390 (US).
- (74) Agents: WISE, Michael, J. et al.; PERKINS COIE LLP, P.O. Box 1208, Seattle, WA 98111-1208 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:  
11 December 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/034996 A3

(54) Title: USE OF LEPTIN FOR TREATING HUMAN LIPOATROPHY AND METHOD OF DETERMINING PREDISPOSITION TO SAID TREATMENT

(57) Abstract: Leptin, leptin analogs, and leptin derivatives are used to treat patients with lipodystrophy. Leptin is effective against lipodystrophy conditions for both genetic and acquired forms of the disease. A therapeutically effective amount of leptin can be administered in a variety of ways, including in a vector comprising nucleic acid sequences encoding leptin. Methods of the present invention contemplate administration of leptin, leptin analogs, and leptin derivatives to patients having approximately 4 ng/ml or less before treatment.

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2003/034996 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/53, (74) Agents: WISE, Michael, J. et al.; PERKINS COIE LLP,  
A61K 38/16, 38/19 P.O. Box 1208, Seattle, WA 98111-1208 (US).(21) International Application Number:  
PCT/US2002/033875(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 22 October 2002 (22.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/536,394 22 October 2001 (22.10.2001) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,  
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN,  
INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks,  
CA 91320 (US).

## Published:

- with international search report
- 
- with amended claims

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DEPAOLI, Alex,  
M. [US/US]; Amgen, Inc., One Amgen Center Drive,  
Thousand Oaks, CA 91320 (US). ORAL, EBF, Arioglu  
[FR/US]; National Institutes of Health, Bethesda, MD  
20892 (US). TAYLOR, Simeon, I. [US/US]; Eli Lilly  
and Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN  
46285 (US). GARG, Abhinav [US/US]; University  
of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines  
Boulevard, Dallas, TX 75390 (US).(88) Date of publication of the international search report:  
11 December 2003

Date of publication of the amended claims: 12 February 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 2003/034996 A3

(54) Title: USE OF LEPTIN FOR TREATING HUMAN LIPOATROPHY AND METHOD OF DETERMINING PREDISPOSITION TO SAID TREATMENT

(57) Abstract: Leptin, leptin analogs, and leptin derivatives are used to treat patients with lipodystrophy. Leptin is effective against lipodystrophy conditions for both genetic and acquired forms of the disease. A therapeutically effective amount of leptin can be administered in a variety of ways, including in a vector comprising nucleic acid sequences encoding leptin. Methods of the present invention contemplate administration of leptin, leptin analogs, and leptin derivatives to patients having approximately 4 ng/ml or less before treatment.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/33875
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : G01N 33/53; A61K 38/16, 38/19 US CL : 436/501; 514/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/501; 514/12 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,Y	SHIMOMURA, I. et al. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy, Nature, 02 September 1999, Vol. 401, pages 73-76, entire article, especially page 75, second column.	1-7, 8,9,11
X,Y	BERG, J. P. Leptin is a potent anti-diabetic in mice with lipodystrophy and insulin resistance, European Journal of Endocrinology (2000), Vol. 142, 114-116.	1, 5, 7, 11, 6, 8, 9,
Y	US 6,258,932 B1 (VAHLNE) 10 July 2001 (10.07.2001), column 3, lines 3-7.	1-9, 11
Y	HADIGAN, C. Metformin in the treatment of HIV Lipodystrophy Syndrome, Journal of the American Medical Association, July 26, 2000, Vol. 284, No. 4, pages 472-477, entire article, especially abstract	1-9, 11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<b>Special categories of cited documents:</b>		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*A* document member of the same patent family	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 September 2003 (12.09.2003)	Date of mailing of the international search report 31 OCT 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Eileen B. O'Hara Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
EAST, PUBMED  
search terms: lipostrophy, lipodystrophy, leptin, protease inhibitor, thiazolidinediones, fibrates, statins, metformin

PCT/US02/33875

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
- 3.  Claim Nos.: 10  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
 G 0 1 N 33/53 G 0 1 N 33/53 D

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アレックス・エム・デパオリ  
 アメリカ合衆国 9 1 3 2 0 カリフォルニア州サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター  
 ・ドライブ、アムジェン・インコーポレイテッド

(72) 発明者 エリフ・アリオグル・オラル  
 アメリカ合衆国 2 0 8 9 2 メリーランド州ベセスダ、ナショナル・インスティテューツ・オブ・ヘルス

(72) 発明者 シメオン・アイ・テイラー  
 アメリカ合衆国 4 6 2 8 5 インディアナ州インディアナポリス、リリー・コーポレイト・センター  
 、イーライ・リリー・アンド・カンパニー

(72) 発明者 アブヒマニュ・ガーク  
 アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州ダラス、ハリー・ハインズ・ブルバード 5 3 2 3 番、ユニ  
 バーシティ・オブ・テキサス・サウスウエスタン・メディカル・センター

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA19 DB01 MA02 MA24 MA43 MA52 MA55 NA14 ZA702  
 ZB211 ZC352 ZC781

专利名称(译)	瘦素用于治疗人体脂肪组织萎缩的用途和用于所述治疗的易感性方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005506994A</a>	公开(公告)日	2005-03-10
申请号	JP2003537565	申请日	2002-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	アレックスエムデパオリ エリフアリオグルオラル シメオンアイテイラー アブヒマニュガーグ		
发明人	アレックス・エム・デパオリ エリフ・アリオグル・オラル シメオン・アイ・テイラー アブヒマニュ・ガーグ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/22 A61K38/55 A61K45/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P43/00 G01N33/74		
CPC分类号	A61K31/155 A61K31/426 A61K38/2264 A61K45/06 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/08 A61P3/10 A61P9/10 A61P21/00 A61P31/18 A61P43/00 G01N33/74 A61K2300/00 G01N33/68		
FI分类号	A61K37/24 A61K45/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P43/00.105 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/DB01 4C084/MA02 4C084/MA24 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/NA14 4C084/ZA702 4C084/ZB211 4C084/ZC352 4C084/ZC781		
优先权	60/336394 2001-10-22 US		
其他公开文献	JP2005506994A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

瘦素，瘦素类似物和瘦蛋白衍生物用于治疗患有脂肪营养不良的患者。瘦素对于遗传和获得性疾病形式的脂肪营养不良病症是有效的。治疗有效量的瘦蛋白可以多种方式施用，包括在包含编码瘦蛋白的核酸序列的载体中。本发明的方法考虑在治疗前向患有约4ng / ml或更少的患者施用瘦蛋白，瘦蛋白类似物和瘦蛋白衍生物。

患者	年齢/性別 /タイプ	脂質降下療法	空腹時 インスリン <sup>1</sup> (μU/mL)	レプチン <sup>2</sup> (ng/mL)	RMR <sup>3</sup> (kcal/日)	総脂質 <sup>4</sup> (%)
NIH-1	17/F 後天性 全身	フェノフィブレート、アトルバスタチン、オーリスチット、週1回の血漿交換	31.2	<0.5	2010	7
NIH-2	17/F 先天性 全身	なし	334	1.0	2030	17
NIH-3	27/F 後天性 全身	なし	19	0.7	1570	18
NIH-4	17/F 先天性 全身	なし	211	1.1	2480	17
NIH-5	15/F 先天性 全身	なし	115	0.8	2670	15
NIH-6	37/F 先天性 全身	なし	25	0.6	1370	15
NIH-7	42/F 家族性 部分	Gumフィブロジール	40.3	3.6	1980	26
UTSW-1	31/F 先天性 全身	フェノフィブレート	61.5	0.7	1702	8
UTSW-2 <sup>5</sup>	33/F 後天性 全身	Gumフィブロジール	12.3	2.4	1497	14