



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 190 888**

② Número de solicitud: 200102689

⑤ Int. Cl.7: **A61K 38/22**

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **03.12.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2003**

Fecha de la concesión: **06.07.2004**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.2004**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2004**

⑦ Titular/es: **Universidad de les Illes Balears  
Facultad de Ciencias, Edif. Guillem Colom  
Casasnovas (Ctra. De Valldemossa Km 7.5)  
07071 Palma de Mallorca, Baleares, ES**

⑦ Inventor/es: **Palou Oliver, Andreu;  
Picó Segura, Catalina;  
Oliver Vara, Paula;  
Cinti, Saverio y  
Matteis, Rita de**

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Nuevas aplicaciones de la leptina como suplemento nutricional.**

⑦ Resumen:

Nuevas aplicaciones de la leptina como suplemento nutricional.

Dichas aplicaciones comprenden su uso como suplemento nutricional. Normalmente dicho uso implica la incorporación de la leptina en preparados alimenticios estando seleccionados dichos preparados alimenticios del grupo formado por preparados de tipo lácteo o sus correspondientes preparados sustitutivos.

Estas aplicaciones son de especial interés en la industria alimentaria, ya que dichos preparados están destinados al consumo por parte de individuos de diferentes especies de mamíferos.

ES 2 190 888 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Nuevas aplicaciones de la leptina como suplemento nutricional.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la industria alimentaria y, en particular, de los suplementos nutricionales para alimentos e ingredientes alimentarios.

10 Más específicamente la presente invención propone nuevas aplicaciones de la proteína leptina como suplemento nutricional en alimentos preparados, especialmente de tipo lácteo.

**Estado de la técnica anterior a la invención**

15 La leptina es una proteína circulante codificada por el gen *ob*, que fue identificado y clonado en 1994 [(1) Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994). *Positional cloning of the mouse ob gene and its human homologue*. Nature 372: 425-432], y que se expresa principalmente por el tejido adiposo.

20 En un primer momento, la leptina fue considerada como una hormona anti-obesidad ya que se observaba que, en ausencia de leptina como consecuencia de una mutación en el gen *ob*, los animales desarrollaban obesidad y diabetes. Este es, por ejemplo, el caso de los ratones *ob/ob*, que carecen de leptina, y que tienen un fenotipo obeso y diabético. Cuando se administra leptina a estos ratones se produce un descenso de la ingesta y un aumento del gasto energético, lo cual conduce a una disminución de la grasa corporal, así como de la glucosa e insulina circulantes [(2) Campfield, L., Smith, F., Gulsez, Y., Devos, R., Burn, P. (1995). *Mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks*. Science 269: 546-549; (3) Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T.E.A. (1995). *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. Science 269: 543-546; (4) Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., Collins, F. (1995). *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. Science 269: 540-543]. En estas circunstancias, la leptina serviría para regular el tamaño de los depósitos grasos del organismo. De hecho, los niveles plasmáticos de esta proteína están en relación directa con la masa adiposa, tanto en roedores como en humanos [(5) Frederich, R.C., Löllmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B.B., Lowell, B.B., Flier, J.S. (1995). *Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity*. J. Clin. Invest. 96: 1658-1663; (6) Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P.A., Friedman, J.M. (1995). *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. Nature Med. 1: 1155-1161. (7) Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., Caro, J.F. (1996). *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N. Engl. J. Med. 334: 292-295].

Otro modelo de obesidad, los ratones *db/db*, sirvió también para aclarar el papel de la leptina en la regulación del peso corporal y contribuyó al descubrimiento de su receptor. Estos animales no responden a la administración de leptina [(3)], y es que no carecen de dicha hormona (como ocurre en los *ob/ob*), sino que por el contrario tienen incrementada la expresión del gen *ob* en el tejido adiposo [(8) Maffei, M., Fei, H., Lee, G-H., Dani, Ch., Leroy, P., Zhang, Y., Proenca, R., Negrel, R., Ailhaud, G., Friedman, J.M. (1995). *Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6957-6960], por lo que presentan altos niveles de leptina circulante. Lo que ocurre es que estos animales tienen una mutación en el gen que codifica para el receptor de la leptina (gen *db*), el cual fue identificado y clonado en 1995 [(9) Tartaglia, L.A., Demski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Muriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Woolf, E.A., Monroe, C.A., Tepper, R.I. (1995). *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell 83: 1263-1271]. Este receptor se expresa en el hipotálamo de ratón de manera abundante, aunque no de manera exclusiva, ya que se encuentra ampliamente distribuido en una diversidad de órganos y tejidos [(9); (10) Kieffer, T.J., Heller, R.S., Habener, J.F. (1996). *Leptin receptor expressed on pancreatic betacells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 224: 522-527; (11) Wang, M.Y., Zhou, Y.T., Newgard, C.B., Unger, R.H. (1996). *A novel leptin receptor isoform in rat*. FEBS Lett. 392: 87-90].

60 La leptina lleva a cabo su acción de dos formas, a saber, a través de efectos centrales y periféricos. Es sabido que, por una parte, la hormona actúa sobre dianas en el SNC (efectos centrales). La leptina es liberada a la circulación y, cuando llega al cerebro, interacciona con su receptor informando del nivel de

las reservas grasas, lo cual determina cambios en el comportamiento alimentario. Como consecuencia de la unión de la leptina a su receptor se altera la expresión de varios genes productores de neuropéptidos específicos que modulan la ingesta (tanto orexigénicos como anorexigénicos) y el gasto energético [(12) Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D.J., Schartz. (1998). *Signals that regulate food intake and energy homeostasis*. Science 280: 1378-1383]. Por otra parte están los efectos periféricos de la leptina, ya que la amplia distribución de su receptor sugiere que esta hormona tiene acciones en tejidos extraneuronales [(13) Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M.Y., Trieu, F., Lee, Y., Newgard, C.B., Unger, R.H. (1997). *Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4637-4641].

Si bien inicialmente se creía que los adipocitos eran la principal fuente de leptina [(14) Moinat, M., Deng, C., Muzzin, P., Assimakopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Dulloo, A.G., Giacobino, J.P. (1995). *Modulation of the obese gene expression in rat brown and white adipose tissues*. FEBS Lett. 373: 131-134], hoy en día se sabe que la leptina también es sintetizada en otros tejidos no-adiposos como la placenta, el epitelio mamario, el músculo esquelético [(15) Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., Nakao, K. (1997). *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat. Med. 3: 1029-1033; (16) Casabiell, X., Pineiro, V., Tome, M.A., Peino, R., Dieguez, C., Casanueva, F.F. (1997). *Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 4270-4273; y (17) Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzalai, N., Rossetti, L. (1998). *A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat*. Nature 393: 684-688] y el estómago (véase más adelante).

Hoy en día se sabe que, aparte de los efectos en la regulación del peso corporal, la leptina tiene otras múltiples funciones. En particular, la leptina lleva a cabo un papel fisiológico importante en varios aspectos de la reproducción en humanos, siendo necesaria para la maduración del eje reproductor [(18) Clarke, I. J., Henry, B.A. (1999). *Leptin and reproduction*. Rev. Reprod. 4: 48-55]. La leptina también ejerce efectos agudos sobre el metabolismo glucídico y lipídico [(19) Wang, M.Y., Lee, Y., Unger, R.H. (1999). *Novel form of lipolysis induced by leptin*. J. Biol. Chem. 274: 17541-17544; (20) Siegrist-Kaiser, C.A., Pauli, V., Juge-Aubry, C.E., Boss, O., Pernin, A., Chin, W.W., Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Burger, A.G., Zapf, J., Meier, C.A. (1997). *Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue*. J. Clin. Invest. 100: 2858-2864]. La leptina también ha sido relacionada con la regulación de la función cardiovascular y renal, y con el funcionamiento del sistema inmune [(21) Haynes, W.G., Sivitz, W.J., Morgan, D.A., Walsh, S.A., Mark, A.L. (1997). *Sympathetic and cardiorenal actions of leptin*. Hypertension 30: 619-623]. Además, también puede desempeñar un importante papel en el desarrollo, tal y como sugiere la producción de leptina en la placenta, así como la presencia de leptina y sus receptores en tejidos fetales y la estimulación de la hematopoyesis y de la angiogénesis por la leptina [(15); (22) Ashworth, C.J., Hoggard, N., Thomas, L., Mercer, J.G., Wallace, J.M., Lea, R.G. (2000). *Placental leptin*. Rev. Reprod. 5: 18-24; (23) Gainsford, T., Willson, T.A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N.A., Alexander, W. S., Hilton, D. J. (1996). *Leptin can induce proliferation, differentiation and functional activation of hemopoietic cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14564-14568; y (24) Sierra-Honigsmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J., Flores-Riveros, J.R. (1998). *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. Science 281: 1683-1685].

Por lo que se refiere a la leptina del estómago, ésta fue descrita por primera vez en ratas adultas en 1998 [(25) Bado, A., Lévassour, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J-P., Bortoluzzi, M-N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., Levin, M.J.M. (1998). *The stomach is a source of leptin*. Nature 394: 790-793] y, en humanos adultos, en el año 2000 [(26) Cinti, S., De Mattei, R., Picó, C., Ceresi, E., Obrador, A., Maffei, C., Oliver, J., Palou, A. (2000). *Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin*. Int. J. Obes. 24: 1-5]. Se sabe que los niveles de esta leptina gástrica en adultos son sensibles al estado nutricional, siendo rápidamente movilizada tras la ingesta que sigue al ayuno, o tras la administración de colecistoquinina y gastrina (hormonas liberadas por el estómago), por lo que podría estar implicada en el control de la saciedad a corto plazo, actuando quizás en sinergia con la colecistoquinina [(25); (26); (27) Sobhani, I., Bado, A., Vissuzaine, G., Buyse, M., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Attoub, S., Lehy, T., Henin, D., Mignon, M., Lewin, M.J. (2000). *Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach*. Gut 47: 178-183; (28) Yuan, C-S., Attele, A.S., Wu, J.A., Zhang, L., Shi, Z.Q. (1999). *Peripheral gastric leptin modulates brain stem neuronal activity in neonates*. Am. J. Physiol. 277: G626-G630]. En consecuencia, la leptina producida por el estómago podría, de alguna manera, estar coordinando la regulación aguda y crónica del comportamiento alimentario, informando al cerebro de la disponibilidad, tanto de recursos energéticos externos (ingesta) como internos (depósitos grasos) [(29) Palou, A., Serra, F., Bonet, M.L.,

Picó, C. (2000). *Obesity: Molecular bases of a multifactorial problem*. Eur. J. Nutr. 39: 127-144]. Sin embargo, aunque sea sabido que la leptina se sintetiza en el estómago, entre otras partes del organismo, y se vislumbren hipotéticas funciones de la misma a este respecto, nadie hasta ahora había estudiado esta hormona durante el periodo perinatal ni llegado a conclusiones (ni siquiera suposiciones) sobre su posible funcionalidad en estas etapas tempranas de la vida, críticas para los determinantes nutricionales que pueden afectar al desarrollo de los organismos.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a nuevas aplicaciones de la leptina como suplemento nutricional.

Como se ha expuesto detalladamente en el apartado anterior, la leptina es una hormona que se produce en una amplia diversidad de tejidos, que además es susceptible de llegar hasta una gran variedad de tejidos y que está implicada en la regulación de diversas funciones, entre las que cabe citar: regulación de la ingesta, de la insulinemia, del balance energético, del metabolismo, de la función neuroendocrina e inmune y del desarrollo del organismo, en general, y en particular del eje reproductor.

Por tanto, la leptina es una hormona con numerosas funciones en el organismo. Es decir, la idea primitiva de que la función de la leptina era casi exclusivamente como hormona anti-obesidad ha cambiado a una funcionalidad mucho más amplia y compleja.

El trabajo realizado por el solicitante para el desarrollo de la presente invención da un paso adelante en este sentido, descubriendo la importancia de la leptina durante las fases iniciales de desarrollo del organismo, y poniendo de manifiesto que el efecto ahora descubierto está basado en la acción externa de la proteína sobre la superficie del estómago.

Por ejemplo, durante el periodo post-natal, a través de la leche materna se ingieren toda una serie de nutrientes y factores reguladores (proteínas o péptidos) que son importantes para el normal desarrollo de los recién nacidos, aunque hasta la presente invención no habían sido considerados. Entre estas proteínas se encuentra la leptina, para la que se han descrito múltiples funciones en el organismo en base a sus efectos sistémicos o endógeno-neurales.

Esta proteína, sin embargo, no ha sido considerada desde su posible acción exógena en el tracto gastrointestinal, tal como se sugiere en la presente invención.

Si bien las proteínas suelen ser hidrolizadas en el tracto gastrointestinal cuando se ingieren vía oral, es sabido que algunas, como por ejemplo las inmunoglobulinas, pasan de la madre al lactante por medio de la leche, sin degradarse en el tracto gastrointestinal y manteniendo, por lo tanto, su funcionalidad íntegra. Puede ocurrir que durante el periodo perinatal no hayan madurado los sistemas de degradación de algunas proteínas. En la presente invención se concluye que éste es el caso con respecto a la leptina gástrica. Ello confiere sentido a la observación realizada en estudios previos [(16)] de que la leptina está presente en la leche materna de forma natural. La presente invención demuestra que la leptina presente en la leche materna es absorbida por el estómago de los neonatos, pudiendo incluso pasar posteriormente a la circulación.

En consecuencia, desde el punto de vista técnico, parece inmediatamente viable la utilidad de adicionar leptina a determinados preparados alimenticios nutricionales, en particular (pero no exclusivamente), a preparados lácteos, por ejemplo, leches para lactantes, formulaciones lácteas de continuación y otros productos alimenticios relacionados (entre los que merecen mención especial los preparados sustitutivos de los lácteos propiamente dichos, que se emplean en casos de alergias, intolerancia a la lactosa, etc.), con el fin de mejorar la calidad y propiedades de los mismos dados los beneficiosos efectos de la leptina sobre el organismo.

Los preparados alimenticios nutricionales de este tipo, que se han venido comercializando hasta la fecha, están suplementados con toda una serie de sustancias fácilmente digeribles (ácidos grasos esenciales, proteínas de alto valor nutricional, vitaminas, y minerales), considerando únicamente el aspecto nutricional (calórico o plástico), pero sin tener en cuenta otras posibles funciones no nutricionales de dichas sustancias, como la que aquí se demuestra para la leptina gastrointestinal.

De acuerdo con la presente invención, se propone la utilización de la leptina como suplemento nutricional a incorporar en dicho tipo de preparados alimenticios. Con ello se pretende mejorar sustancialmente la

calidad y propiedades de dichos productos aportándoles, además de todos los componentes necesarios desde el punto de vista nutricional, un suplemento nutricional (a saber, la leptina) que ha mostrado una importante función de mejora del desarrollo del organismo en esas fases tempranas de la vida del individuo.

5 El solicitante ha llevado a cabo experimentos en ratas, que son generalizables a humanos, cuyos resultados demuestran la presencia de leptina en su estómago durante el periodo perinatal. Conforme a dichos resultados, la leche materna sería el principal proveedor de leptina durante el periodo de lactancia, mientras que la producción de leptina endógena aumentaría con la suspensión de la lactancia materna y el cambio a una dieta sólida.

10 Adicionalmente, dichos resultados demuestran el papel fisiológico de la leptina del sistema gastrointestinal, ya en etapas tempranas del desarrollo, al ser sensible a la regulación por parte de la ingesta de leche, así como al cambio de dieta hacia una dieta sólida.

15 Dichos experimentos se encaminaron por una parte a la evaluación de los niveles de ARNm de leptina y de los niveles de la propia leptina en estómago de rata durante diferentes etapas del desarrollo perinatal medidos por técnicas de RT-PCR y ELISA respectivamente y, por otra, al estudio por técnicas inmunohistoquímicas de la localización de leptina y sus niveles en estómago de rata durante las fases tempranas de desarrollo del individuo.

20 Seguidamente se comentan ambos tipos de experimentos y sus resultados con más detalle:

Experimento 1

25 Con el objetivo de conocer la posible presencia de leptina en estómago de rata en la etapa de desarrollo temprano, se evaluaron, por una parte, los niveles de ARNm de leptina en estómago a distintas edades mediante la técnica de “*northern blotting*”. Los resultados muestran que el ARNm de leptina se detecta incluso en la etapa fetal, (niveles basales), aumentando los niveles de expresión progresivamente a partir de las 4 horas de vida (momento en el que los animales empiezan a mamar) y durante el primer mes de vida, paralelamente al desarrollo de las glándulas del estómago, con un marcado incremento en ratas de 30 15 días (ver Figura 1).

El hecho de que el primer incremento significativo en los niveles de ARNm de leptina en estómago se produzca a partir de las 4 horas de vida, podría deberse a un efecto estimulador de dicha síntesis por la 35 ingesta de leche (la succión). Para estudiar esta posibilidad se evaluaron los niveles de ARNm de leptina en estómagos de ratas recién nacidas (0 h de vida) y de 4 y 8 horas de vida, así como en ratas de 4 y 8 horas de vida que habían sido separadas de su madre en el momento de nacer (ratas en ayuno). Los niveles de ARNm de leptina eran significativamente mayores en los estómagos de ratas de 8 horas de vida, comparado con los niveles de las ratas que se sacrificaron antes de que empezaran a mamar (0 y 4 40 horas de vida) y con los de las ratas de 8 horas que se habían mantenido en ayunas (ver Tabla 1).

TABLA 1

Expresión de ARNm de leptina en estómago de ratas de 0, 4 y 8 horas de vida (C, controles) y de ratas privadas de mamar durante las primeras 4 y 8 horas de vida (A, en ayunas), medido por RT-PCR. 45 Los valores están expresados como porcentaje del nivel máximo de expresión, que se fijó en un 100%. Los resultados representan las medias  $\pm$  SEM. (n=3-7).

\* Significancia estadística versus valor a las 0 horas;

50 □ efecto del ayuno, P<0,05, test de la t de Student.

Horas de vida	Leptina (%)
0	68,31 $\pm$ 5,49
4 (C)	60,75 $\pm$ 1,51
4 (A)	70,49 $\pm$ 6,05
8 (C)	100 $\pm$ 7,34 *
8 (A)	71,95 $\pm$ 9,13 □

Estos resultados parecen confirmar que el inicio de la succión puede ser un estímulo para la síntesis de ARNm de leptina.

5 Por otra parte se estudió la presencia de la proteína leptina, también en estómagos de rata en distintas etapas del desarrollo temprano, usando un kit de ELISA específico para dicha proteína. Los resultados muestran también la presencia de la proteína en el estómago de rata en estas etapas de la vida. En concreto se observa que los niveles de leptina son transitoriamente elevados en el momento del nacimiento, se mantienen bajos durante todo el periodo de lactancia y se incrementan a partir del día 21, coincidiendo precisamente con el momento en el que se pasa de ingerir leche materna a una dieta sólida (pienso) (ver Figura 2). Por lo tanto, la ingesta de leche podría ser la responsable de que los niveles de leptina se mantuvieran bajos durante todo el periodo de lactancia (probablemente por un mecanismo inhibitorio provocado por la leptina láctea actuando a través de los correspondientes receptores de leptina presentes en el estómago).

15 Se observa adicionalmente que los cambios en los niveles de leptina no van acompañados de cambios paralelos en los niveles del ARNm. Por ello, para obtener algún dato aclaratorio de esta situación, se estudió la localización de la proteína en el estómago mediante el siguiente experimento.

#### Experimento 2

20 En este experimento se estudió, mediante técnicas inmunohistoquímicas, la localización de la leptina en el estómago así como sus niveles en las primeras fases del desarrollo de las crías de rata.

Los resultados de inmunohistoquímica revelaron que los elevados valores de leptina presentes en el nacimiento no corresponden a un elevado contenido de leptina en las glándulas del estómago, sino que la leptina está localizada en la superficie del epitelio del estómago. Por tanto, la inmunohistoquímica sugiere la presencia de leptina de diferentes fuentes (endógena y exógena) en el estómago durante el desarrollo temprano. El hecho de encontrar leptina en el feto (etapa prenatal) es el resultado de la ingestión de líquido amniótico. Por su parte, el hecho de encontrar leptina en el individuo recién nacido y en el lactante “temprano” (etapa post-natal), demuestra la importancia de la ingestión oral de leptina procedente de la leche materna (ver Figura 3). Además, estos resultados permiten observar la presencia de leptina en la superficie de las gotas de leche que están siendo absorbidas por el estómago, lo cual demuestra que el estómago está absorbiendo la leptina presente en la leche materna, siendo presumible que sea precisamente esa leptina la que lleve a cabo su función en el neonato.

35 En definitiva, estos estudios demuestran la presencia de ARNm de leptina, así como de la propia leptina, en el estómago de rata durante el periodo perinatal, y que los niveles de ambos (tanto ARNm como leptina) se incrementan con la edad. Además, se observa que durante el periodo de lactancia, la leche materna debería constituir el principal suministro de leptina, mientras que la producción de leptina endógena se incrementaría con la suspensión de la lactancia y el cambio a una dieta sólida.

Analizando los resultados anteriores en su conjunto, el incremento, a partir de niveles basales, en la expresión de ARNm de leptina en las ratas que empiezan a mamar y el evidente incremento en los niveles de ARNm y leptina en ratas que empiezan a ingerir dieta sólida, podría justificar la posible función reguladora de la ingesta por parte de la leptina en el estómago.

Los resultados obtenidos en sendos experimentos así como el estudio de los correspondientes resultados, justifican el interés del objeto fundamental de la presente invención, a saber, el nuevo uso de la leptina como suplemento nutricional alimenticio, vía oral, por sus efectos beneficiosos para el organismo en cualquier etapa vital, pero especialmente para neonatos y lactantes, contribuyendo a mejorar el crecimiento y las distintas funciones metabólicas del organismo.

De acuerdo con la presente invención se propone la incorporación de leptina en preparados alimenticios, especialmente de tipo lácteo.

55 Dichos preparados alimenticios pueden estar destinados al consumo de individuos de diferentes especies de mamíferos: humanos, animales domésticos, ganado o animales de granja, etc. Es aconsejable emplear leptinas de la misma especie a que vaya destinado el consumo de los preparados alimenticios para evitar posibles reacciones alérgicas, si bien la invención no debe considerarse limitada por esta recomendación, siendo posible emplear leptina de una especie en un producto alimenticio destinado a otra especie.

Por su parte, dichos preparados alimenticios pueden ir destinados a individuos de cualquier edad, desde el nacimiento hasta la edad adulta.

En una realización preferida de la presente invención se prefiere destinar el preparado alimenticio a la especie humana. En una realización aún más preferida, dicho preparado alimenticio es una formulación láctea destinada a humanos recién nacidos, lactantes, niños y adultos. Incluso en una realización todavía más preferida, dicho preparado alimenticio es un preparado lácteo seleccionado entre una formulación láctea para lactantes y una formulación láctea de continuación.

La proporción de leptina a incorporar puede variar dentro de un amplio rango dependiendo de la naturaleza del preparado, de la especie a la que vaya destinado, de la edad del individuo y de su estado de salud, así como del fin que se pretenda obtener.

Generalmente, en el caso de preparados lácteos para recién nacidos o crías de la correspondiente especie, se prefiere incorporar leptina en una cantidad que se corresponda con la proporción de la misma existente en la correspondiente leche materna. Así, en el caso de humanos, los preparados lácteos destinados a la alimentación de bebés suelen incorporar entre 20 y 600 ng/100 mL de leptina, que es el margen de concentración normal en la leche de mujer durante el período de lactancia (este amplio rango viene justificado porque la concentración de leptina en la leche varía en las distintas etapas de la lactancia, en los diferentes tipos de poblaciones (según raza, nivel de desarrollo, tipo de alimentación, etc.) e incluso de una mujer a otra dentro del mismo tipo de población; además, los valores de leptina son dependientes del tipo de metodología de análisis que se emplee para su determinación). Dentro de dicho margen, es posible la preparación de diferentes tipos de formulaciones dependiendo del contenido en leptina de las mismas. Así, es posible preparar “formulaciones con un alto contenido de leptina” las cuales incluirían una cantidad de leptina del orden de 400-600 ng/100 mL; “formulaciones con un contenido medio de leptina” las cuales incluirían una cantidad de leptina del orden de 100-400 ng/100 mL; y “formulaciones con un bajo contenido de leptina” las cuales incluirían una cantidad de leptina del orden de 20-100 ng/100 mL. De acuerdo con esto, si se desea o es necesario, sería posible preparar formulaciones individualizadas cuyo contenido de leptina coincidiera con el contenido de leptina de la leche materna en cada caso concreto que se deseara tratar.

Para su empleo de acuerdo con la presente invención, la leptina puede encontrarse en cualquier forma que se desee siempre que sea adecuada para su incorporación al producto alimenticio. Así, puede encontrarse en forma de polvo, gránulos, tabletas, comprimidos, pelets, cápsulas, soluciones, suspensiones, etc. Incluso sería posible administrar la leptina simplemente disuelta en agua, en la cantidad correspondiente.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Expresión de ARNm de leptina en estómago de rata durante distintas etapas del desarrollo perinatal, medido por RT-PCR. Los valores están expresados como porcentaje del nivel máximo de expresión, que se fijó en un 100 %. Los resultados representan las medias  $\pm$  SEM. (n=4-8).

Figura 2: Niveles de leptina (ng/g de tejido) en estómago de ratas durante distintas etapas del desarrollo perinatal, medido por ELISA. Los resultados representan las medias  $\pm$  SEM (n=3, medidos por duplicado).

Figura 3: Resultados de inmunohistoquímica para la leptina en la mucosa gástrica (la leptina aparece teñida de color marrón):

- A) Mucosa gástrica de fetos de 20 días. Se aprecia una débil tinción positiva (leptina) en las células superficiales de la mucosa (flechas).
- B) Mucosa gástrica de una rata de 2 días de edad. La inmunoreactividad para la leptina aparece rodeando las gotas de leche que se están absorbiendo (flechas).
- C) Mucosa gástrica de ratas de 15 días de edad. La leptina aparece sobre todo en las glándulas del estómago, en concreto en la parte basal (producción endógena de leptina).
- D) Mucosa gástrica de ratas de 21 días de edad. La leptina aparece localizada en multitud de células glandulares.

### Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, que no pretende en absoluto ser restrictivo de su alcance.

## ES 2 190 888 B1

### Ejemplo 1

El presente Ejemplo ilustra una formulación de leche para lactantes o “preparado para lactantes” destinado a satisfacer los requerimientos nutricionales de los bebés durante los primeros cuatro a seis meses de vida. Estos preparados tienen un contenido energético medio comprendido entre 60 y 75 kcal/100 mL, y están constituidos por: proteínas, lípidos, carbohidratos, sustancias minerales y vitaminas tal como se detalla en la siguiente tabla (para composición detallada: Official Journal of the European Communities No L 175, 4-7-1991, p. 40-42, y modificaciones en No L 49, 28-2-1996, p. 14-16).

Componente	Energía (mínimo-máximo)	Tipo
<i>Proteínas</i>	1,8-3 g/100 kcal 2,25-3 g/100 kcal	Proteínas de leche de vaca Proteínas de soja y proteínas parcialmente hidrolizadas
<i>Lípidos</i>	4,4-6,5 g/100 kcal	Ácido laurico Ácido mirístico Ácido linoleico
<i>Carbohidratos</i>	7-14 g/100 kcal	Lactosa Maltosa Sacarosa Malto-dextrinas Siropo de glucosa Almidón
<i>Sustancias minerales</i>	20-60 mg/100 kcal 60-145 mg/100 kcal 50-125 mg/100 kcal 50- -- mg/100 kcal 25-90 mg/100 kcal 5-15 mg/100 kcal 0,5-1,5 mg/100 kcal 0,5-1,5 mg/100 kcal 20-80 µg/100 kcal 5 - -- µg/100 kcal -- - 3 µg/100 kcal	Sodio Potasio Cloro Calcio Fósforo Magnesio Hierro Cinc Cobre Yodo Selenio
<i>Vitaminas</i>	60-180 µg/100 kcal 1-2,5 µg/100 kcal 40 - -- µg/100 kcal 60 - -- µg/100 kcal 0,8 - -- mg/100 kcal 300 - -- µg/100 kcal 35 - -- µg/100 kcal 1,5 - -- µg/100 kcal 4 - -- µg/100 kcal 0,1 - -- µg/100 kcal 8 - -- mg/100 kcal 4 - -- µg/100 kcal 0,5 - -- mg/100 kcal	Vitamina A Vitamina D Tiamina Riboflavina Niacina Ácido pantoteico Vitamina B6 Biotina Ácido fólico Vitamina B12 Vitamina C Vitamina K Vitamina E

A esta mezcla láctea se añade leptina, como suplemento nutricional, durante su formulación en una concentración entre 400-600 ng/100 mL.

## ES 2 190 888 B1

### Ejemplo 2

Este Ejemplo es análogo al Ejemplo 1 anterior, con la diferencia de que se añade leptina a una concentración comprendida entre 100-400 ng/100 mL.

5

### Ejemplo 3

Este Ejemplo es análogo al Ejemplo 1 anterior, con la diferencia de que se añade leptina a una concentración comprendida entre 20-100 ng/100 mL.

10

### Ejemplo 4

Este Ejemplo es análogo al Ejemplo 1 anterior, con la diferencia de que se lleva a cabo un tratamiento individualizado en cuanto a la concentración de leptina a adicionar, con el fin de que se adapte a los valores determinados en la leche de una madre lactante voluntaria. De acuerdo con lo anterior se añade leptina a una concentración de 16 ng/100 mL.

15

Del mismo modo que se ha expuesto en los Ejemplos anteriores, puede obtenerse una leche de continuación, cuya formulación se adapte a la vigente normativa (ver Official Journal of the European Communities No L 175, 4-7-1991, p. 43-44, y modificaciones en No L 49, 28-2-96, p. 15, para composición detallada).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

**REIVINDICACIONES**

1. Nuevas aplicaciones de la leptina, **caracterizadas** porque comprenden su uso como suplemento nutricional.

2. Nuevas aplicaciones de la leptina, según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque dicho uso implica la incorporación de la leptina en preparados alimenticios.

3. Nuevas aplicaciones de la leptina, según la reivindicación 2, **caracterizadas** porque dichos preparados alimenticios están seleccionados del grupo formado por preparados de tipo lácteo o sus correspondientes preparados sustitutivos.

4. Nuevas aplicaciones de la leptina, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizadas** porque dichos preparados están destinados al consumo por parte de individuos de diferentes especies de mamíferos.

5. Nuevas aplicaciones de la leptina, según la reivindicación 4, **caracterizadas** porque dichas especies se seleccionan entre humanos, animales domésticos, ganado y animales de granja.

6. Nuevas aplicaciones de la leptina, según las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizadas** porque dichos preparados están destinados al consumo de individuos de cualquier edad, comprendida entre el nacimiento y la edad adulta.

7. Nuevas aplicaciones de la leptina, según las reivindicaciones 4 y 6, **caracterizadas** porque dicho individuo es un humano recién nacido o un bebé lactante.

8. Nuevas aplicaciones de la leptina, según la reivindicación 3, **caracterizadas** porque dicho preparado lácteo está seleccionado entre una formulación láctea para lactantes, una formulación láctea de continuación, o las correspondientes formulaciones sustitutivas de las mismas.

9. Nuevas aplicaciones de la leptina, según la reivindicación 8, **caracterizadas** porque la leptina se incorpora en dicha formulación en una proporción de 20 y 600 ng/100 mL.

10. Nuevas aplicaciones de la leptina, según la reivindicación 8, **caracterizadas** porque la leptina se incorpora en dicha formulación en una cantidad individualizada que es aproximadamente igual a la cantidad presente en la leche de la madre a la cual la formulación pretende sustituir, pudiendo estar dicha cantidad individualizada fuera de los límites teóricos indicados en la reivindicación 9 anterior.

11. Nuevas aplicaciones de la leptina, según la reivindicación 9, **caracterizadas** porque la leptina puede emplearse en cualquier forma apta para su incorporación en dicha formulación.

12. Nuevas aplicaciones de la leptina, según la reivindicación 11, **caracterizadas** porque la leptina se emplea en una forma seleccionada entre polvo, gránulos, tabletas, comprimidos, pellets, cápsulas, soluciones o suspensiones.

13. Nuevas aplicaciones de la leptina, según las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizada** porque la leptina se emplea disuelta en agua, lista para su ingestión directa o para su incorporación a dicha formulación.

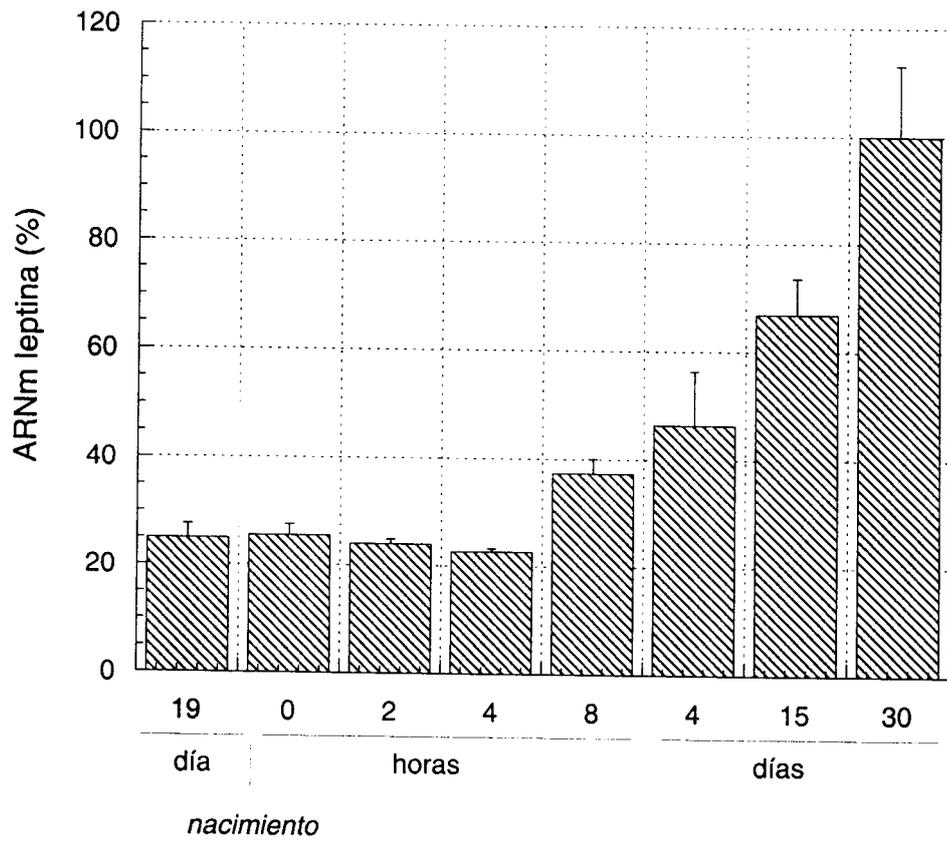


FIGURA 1

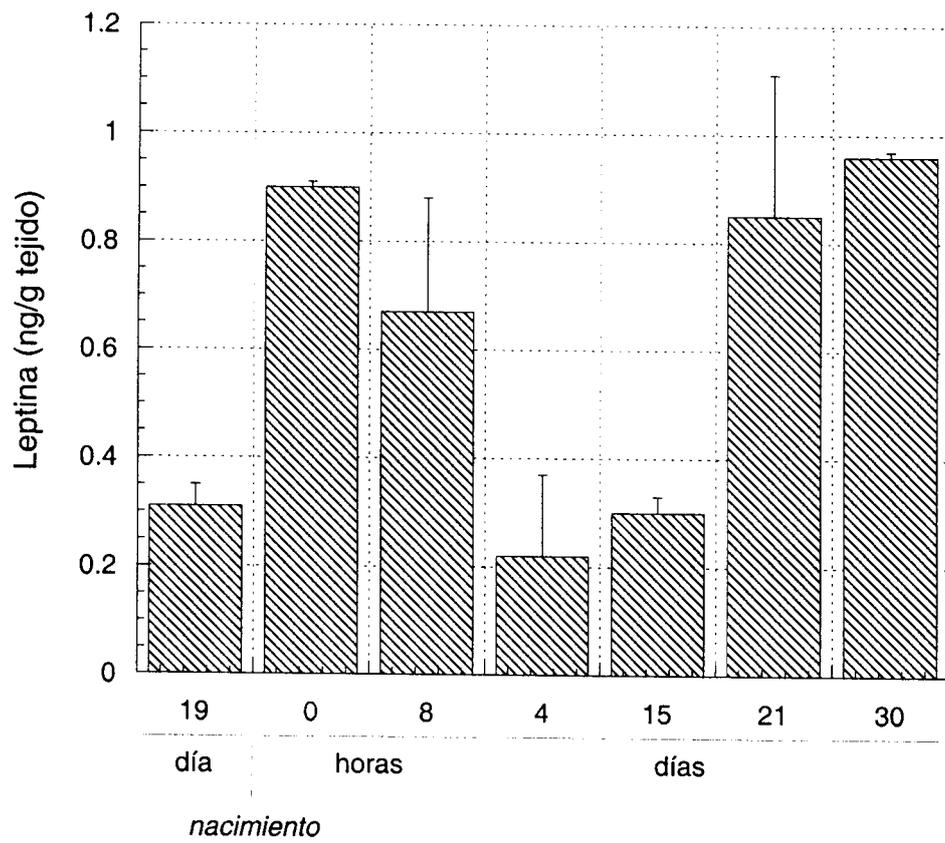
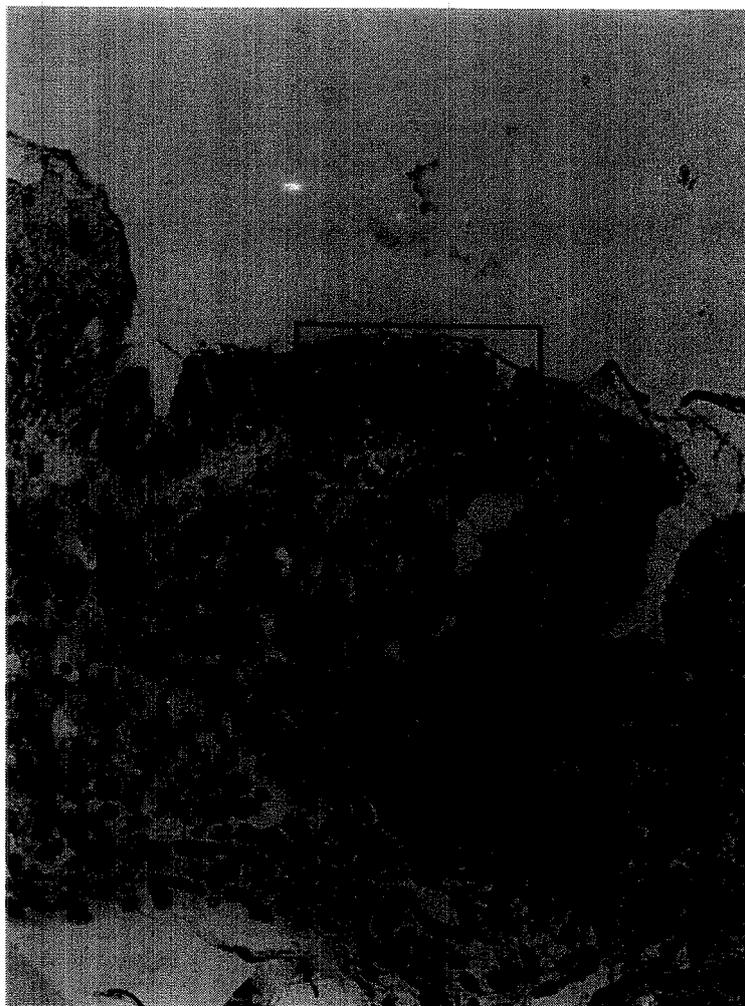


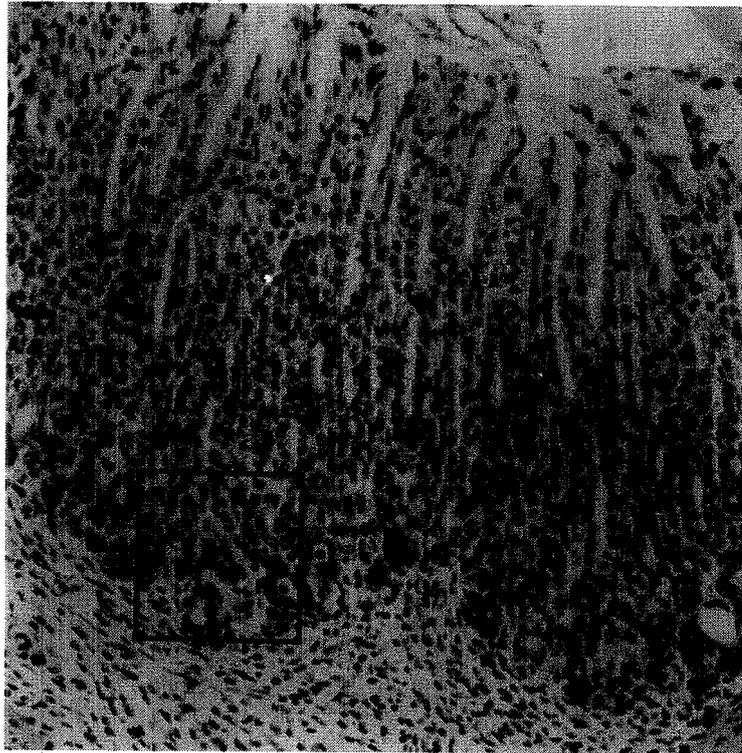
FIGURA 2



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIG. 3C**



**FIG. 3D**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 190 888

② Nº de solicitud: 200102689

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.12.2001

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 38/22

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
E	WO 03020303 A1 (THE UNIVERSITY OF BUCKINGHAM) 13.03.2003, página 11, líneas 20-27; página 12, línea 30 - página 13, línea 22; página 24, línea 34 - página 25, línea 2; página 25, líneas 23-29.	1-13
E	US 20020015709 A (KIRWIN) 07.02.2002	1-13
A	HOUSEKNECHT, K.L. et al. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 240 (3), páginas 742-747.	
A	BRYSON, J.M. The future of leptin analogues in the treatment of obesity. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2000, 2, páginas 83-89.	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.07.2003

Examinador

J. López Nieto

Página

1/1