

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 440**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04765283 .9**
- 96 Fecha de presentación: **16.09.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1671122**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

54 Título: **Diagnóstica y terapéutica para enfermedades asociadas con el receptor acoplado de proteína G ADIPOR2 (ADIPOR2)**

30 Prioridad:  
**27.09.2003 EP 03021898**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.08.2012**

73 Titular/es:  
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.  
511 BENEDICT AVENUE  
TARRYTOWN, NY 10591, US**

72 Inventor/es:  
**GOLZ, Stefan;  
BRÜGGEMEIER, Ulf y  
GEERTS, Andreas**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 386 440 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Diagnóstica y terapéutica para enfermedades asociadas con el receptor acoplado de proteína G ADIPOR2 (ADIPOR2).

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención está en el campo de la biología molecular, más particularmente la presente invención se relaciona con secuencias de ácidos nucleicos de una AdipoR2 humano y su regulación para el diagnóstico del cáncer en mamíferos.

Antecedentes de la invención

Receptores acoplados de proteína G

- 10 La AdipoR2 es un receptor acoplado de la proteínas G transmembrana de nivel siete (GPCR) [Yamauchi et al., (2003), WO200190304, WO200157190]. Muchos procesos biológicos significativos médicamente son mediados por la transducción de rutas de señales que involucran proteínas G [Lefkowitz, (1991)]. La familia de receptores acoplados de proteínas G (GPCR) incluyen receptores para hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y virus. Ejemplos específicos de los GPCR incluyen receptores para agentes tan diversos como la dopamina, calcitonina, hormonas adrenérgicas, endotelina, cAMP, adenosina, acetilcolina, serotonina, histamina, trombina, kinina, hormona estimulante de los folículos, ópsinas, el gen 1 de diferenciación endotelial, rodopsinas, odorantes, citomegalovirus, proteínas G en sí mismas, proteínas efectoras tales como fosfolipasa C, adenilciclasa y fosfodiesterasa, y proteínas actuadoras tales como proteína quinasa A y proteína quinasa C.

- 20 Las GPCR poseen siete dominios de barrido de membrana conservados que conectan al menos ocho bucles hidrofílicos divergentes. Las GPCR también conocidas como receptores de transmembrana siete, 7TM, han sido caracterizadas por incluir estos siete alargamientos hidrofóbicos conservados de aproximadamente 20 a 30 aminoácidos, conectando al menos ocho bucles hidrofílicos divergentes. La mayor parte de las GPCR tienen residuos de cisteína sencillos conservados en cada uno de los dos primeros bucles extracelulares, los cuales forman puentes disulfuro que se cree estabilizan la estructura funcional de la proteína. Las siete regiones de la transmembrana se designan como TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, y TM7. La TM3 ha sido implicada con la transducción de señales. La fosforilación y la lipidación (palmitilación o farnesilación) de los residuos de cisteína pueden influir en la transducción de señales de algunos GPCR. La mayor parte de las GPCR contienen sitios de fosforilación potencial dentro del tercer bucle citoplásmico y/o el término carboxi. Para varios GPCR, tales como el receptor beta-adrenérgico, la fosforilación por parte de la proteína quinasa A y/o quinasas receptoras específicas media la desensibilización del receptor.

- 30 Para algunos receptores, los sitios de enlazamiento del ligando de GPCR se cree que comprenden bolsillos hidrofílicos formados por varios dominios de transmembrana GPCR. Los bolsillos hidrofílicos están rodeados por residuos hidrófobos de la GPCR. El lado hidrofílico de cada hélice transmembrana de GPCR es postulado para mirar hacia dentro y formar un sitio de enlazamiento de ligando polar. La TM3 ha sido implicada con varios GPCR por tener sitios de enlazamiento de ligando, tales como el residuo aspartato TM3. Las TM5 serinas, una TM6 asparagina, y TM6 o TM7 fenilalaninas o tirosinas también están implicadas en el enlazamiento del ligandos.

- 40 Las GPCR están acopladas dentro de la célula por proteínas heterotriméricas G a diversas enzimas intracelulares, canales iónicos y transportadores. Diferentes subunidades alfa de proteína G estimulan preferencialmente efectores particulares para modular diversas funciones biológicas en una célula. La fosforilación de residuos citoplásmicos de GPCR es un mecanismo importante para la regulación de algunos GPCRs. Por ejemplo, en una forma de transducción de señal, el efecto del enlazamiento de la hormona es la activación de la enzima, adenilato ciclasa, dentro de la célula. La activación enzimática por hormonas depende de la presencia del nucleótido GTP. El GTP también influye en el enlazamiento de las hormonas. Una proteína G conecta el receptor de la hormona a la adenilato ciclasa. La proteínas G intercambia GTP para GDP de frontera cuando se activa por parte de un receptor hormonal. La forma de transporte de GTP enlaza entonces a la adenilato ciclasa. La hidrólisis de GTP a GDP, catalizada por la propia proteína G misma, hace regresar la proteína G a su forma basal inactiva. Así, la proteína G cumple un papel doble, como intermedio que regula la señal desde el receptor hasta el efector, y como un reloj que controla la duración de la señal.

- 50 Durante los últimos 15 años, se han introducido en el mercado exitosamente cerca de 350 agentes terapéuticos que apuntan a los receptores 7TM. Esto indica que estos receptores tienen una historia establecida y probada como objetivos terapéuticos. Claramente, hay necesidad para identificar y caracterizar receptores adicionales, que puedan jugar un papel en la prevención, mejora o corrección de disfunciones o enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades tales como infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias y virales, particularmente las causada por virus VIH, cánceres, alergias incluyendo asma, enfermedades cardiovasculares incluyendo fallo cardíaco agudo, hipotensión, hipertensión, angina pectoris, infarto del miocardio, enfermedades hematológicas, enfermedades genitourinarios incluyendo incontinencia urinaria e hiperplasia benigna de la próstata, osteoporosis, trastornos del sistema nervioso periférico y central incluyendo dolor, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de

Parkinson, enfermedades respiratorias, enfermedades metabólicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades gastrointestinales, enfermedades del sistema endocrino, enfermedades dermatológicas, enfermedades de los músculos o el esqueleto, enfermedades inmunológicas, enfermedades del desarrollo o enfermedades del sistema reproductivo.

5 Tecnología TaqMan/perfil de expresión

El TaqMan es una técnica recientemente desarrollada, en la cual la liberación de un pigmento informador fluorescente a partir de una sonda de hibridación en tiempo real durante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) es proporcional a la acumulación del producto de PCR. La cuantificación se basa en la parte temprana lineal de la reacción, y por la determinación del ciclo de umbral (CT), en el cual se detecta primeramente la señal de fondo de fluorescencia anterior.

Las tecnologías de expresión genética pueden ser útiles en varias áreas del descubrimiento y desarrollo de fármacos, tales como identificación de objetivo, optimización de candidatos e identificación de mecanismos de acción. La tecnología TaqMan puede ser utilizada para comparar diferencias entre perfiles de expresión de tejidos normales y tejidos enfermos. Se ha utilizado los perfiles de expresión para identificar genes, los cuales están súper o subregulados en una variedad de enfermedades. Una aplicación interesante del perfil de expresión es el monitoreo temporal de cambios en la expresión genética durante la progresión de las enfermedades y el tratamiento con fármacos o en pacientes contra individuos saludables. La premisa en esta metodología es que los cambios en el patrón de expresión genética en respuesta a los estímulos fisiológicos o ambientales (por ejemplo fármacos) pueden servir como pista indirecta acerca de los genes que causan las enfermedades o de los objetivos de los fármacos. Adicionalmente, los efectos de los fármacos con eficacia establecida sobre patrones de expresión genética global pueden proveer una guía, o una firma genética, contra la cual puede compararse el nuevo candidato fármaco.

AdipoR2

La secuencia de nucleótidos de AdipoR2 está accesible en bases de datos públicos mediante el número de acceso NM\_024551 y se da en SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de AdipoR2 está representada en SEQ ID NO: 2.

Los receptores de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, sirven como receptores para la adiponectina globular y de longitud completa y media las actividades incrementadas de los ligandos AMPK y PPAR-alfa, así como la oxidación de los ácidos grasos y el consumo de glucosa por la adiponectina [Yamauchi et al., (2003)]. Yamauchi et al. [Yamauchi et al., (2003)] aisló ADIPOR1 y ADIPOR2 que codifican ADNc por clonación de expresión.

30 El receptor AdipoR2 está publicado en [Yamauchi et al., (2003)] y en las patentes WO200190304 y WO200157190.

Resumen de la invención

La invención se relaciona con novedosas asociaciones con enfermedades de polipéptidos y polinucleótidos de AdipoR2. La invención también se relaciona con métodos novedosos para diagnosticar una enfermedad comprendida en el grupo de enfermedades consistentes de cáncer, en un mamífero, que comprende las etapas de

- 35 i) determinar la cantidad de polinucleótido de AdipoR2 en una muestra tomada de dicho mamífero,
- ii) determinar la cantidad del polinucleótido de AdipoR2 en mamíferos saludables y/o enfermos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de AdipoR2 (SEC ID NO: 1).

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido de AdipoR2 (SEQ ID NO: 2).

40 La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador útil para la invención (SEQ ID NO: 3).

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador útil para la invención (SEQ ID NO: 4).

La Figura 5 muestra una secuencia de nucleótidos útil como sonda para detectar las proteínas de la invención (SEQ ID NO: 5).

Descripción detallada de la invención

45 Definición de términos

Un "oligonucleótido" es un alargamiento de residuos de nucleótidos que tiene un número de bases suficiente para ser utilizado como un oligómero, amplímero, o sonda en una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos se preparan a partir de secuencias genómicas o de ADNc y se utilizan para amplificar, revelar o confirmar la presencia de ADN o ARN similares en una célula o tejido en particular. Los oligonucleótidos u

oligómeros comprenden porciones de secuencias de ADN que tienen al menos 10 nucleótidos y hasta tanto como 35 nucleótidos, preferiblemente alrededor de 25 nucleótidos.

- 5 "Sondas" pueden derivarse a partir de ácidos nucleicos de cadena sencilla o doble de origen natural o recombinantes o pueden ser sintetizadas químicamente. Son útiles en la detección de la presencia de secuencias idénticas o similares. Tales sondas pueden marcarse con moléculas informadoras utilizando muescas de transición, reacción de llenado de Klenow, PCR u otros métodos bien conocidos en la técnica. Las sondas de ácidos nucleicos pueden utilizarse en hibridaciones southern, northern o in situ para determinar si el ADN o el ARN que codifican una cierta proteína están presentes en un tipo de célula, tejido u órgano.
- 10 Un "fragmento de un polinucleótido" es un ácido nucleico que comprende todo o una parte de una molécula de nucleótido dada, teniendo el fragmento menos nucleótidos de aproximadamente 6 kb, preferiblemente menos de aproximadamente 1 kb.
- "Moléculas informadoras" son radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, o cromogénicos los cuales se asocian con un nucleótidos o una secuencia de aminoácidos en particular, estableciendo así la presencia de cierta secuencia, o permitiendo la cuantificación de una cierta secuencia.
- 15 Moléculas "quiméricas" pueden construirse introduciendo toda o parte de la secuencia de nucleótidos de esta invención en un vector que contiene secuencias adicionales de ácido nucleico de las cuales podría esperarse que cambiaran cualquiera o varias de las siguientes características del AdipoR2: localización celular, distribución, afinidades de enlace con ligando, afinidades intercadena, rata de degradación/rendimiento, señalización, etc.
- 20 "Activo", con respecto al polipéptido de AdipoR2, se refiere a aquellas formas, fragmentos, o dominios de un polipéptido de AdipoR2 el cual retiene la actividad biológica y/o antigénica de un polipéptido de AdipoR2.
- "Polipéptido de AdipoR2 de origen natural" se refiere a un polipéptido producido por células que no han sido manipuladas genéticamente y específicamente contempla diversos polipéptidos que surgen de las modificaciones postranslacionales del polipéptido incluyendo pero no limitándose a acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.
- 25 "Derivado" se refiere a polipéptidos que han sido modificados químicamente por técnicas tales como ubiquinación, marcación (véase más arriba), pegilación (derivación con polietilenglicol) e inserción o sustitución química de aminoácidos tales como ornitina los cuales normalmente no se presentan en proteínas humanas.
- 30 "Sustituciones conservadoras de aminoácidos" resultan del remplazo de un aminoácido con otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el remplazo de una leucina con una isoleucina o valina, de un aspartato con un glutamato, o de una treonina con un serina.
- "Inserciones" o "eliminaciones" están típicamente en el rango de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede ser determinada experimentalmente produciendo el péptido por vía sintética, mientras que sistemáticamente se hacen inserciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en la secuencia utilizando técnicas de ADN recombinante.
- 35 Una "secuencia de señales" o "secuencia líder" puede utilizarse, cuando se desee, para dirigir el polipéptido a través de una membrana de una célula. Tal secuencia puede estar presente de forma natural en polipéptidos o puede ser provista a partir de fuentes heterólogas mediante técnicas de ADN recombinante.
- Un "oligopéptido" es un alargamiento corto de residuos de aminoácidos y puede expresarse a partir de un oligonucleótido. Los oligopéptidos comprenden un alargamiento de residuos de aminoácidos de al menos 3, 5, 10 aminoácidos y como máximo 10, 15, 25 aminoácidos, típicamente de al menos 9 a 13 aminoácidos, y de longitud suficiente para desplegar actividad biológica y/o antigénica.
- 40 "Inhibidor" es cualquier sustancia que retarda o evita una reacción o respuesta química o fisiológica. Inhibidores comunes incluyen pero no se limitan a moléculas antisentido, anticuerpos, y antagonistas.
- 45 "Expresión estándar" es una medición cuantitativa o cualitativa para comparación. Se basa sobre un número estadísticamente apropiado de muestras normales y se crea para ser utilizado como base de comparación cuando se llevan a cabo ensayos diagnósticos, ejecución de ensayos clínicos, o después de perfiles de tratamiento a un paciente.
- "Animal", tal como se utiliza aquí puede definirse para incluir humanos, domésticos (por ejemplo, gatos, perros, etc.), agrícolas (por ejemplo, vacas, caballos, ovejas, etc.) o especies de prueba (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.)
- 50 Un "polinucleótido de AdipoR2", dentro del significado de la invención, debe entenderse como una molécula de ácido nucleico seleccionada de un grupo consistente de

(i) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,

(ii) moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 1,

(iii) moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 1,

5 (iv) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida bajo condiciones restrictivas a una molécula de ácido nucleico de (i), (ii), o (iii); y

(v) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de la molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético;

en donde el polipéptido codificado por dicha molécula de ácido nucleico tiene una actividad de AdipoR2.

10 Un "polipéptido de AdipoR2", dentro del significado de la invención, se entenderá como un polipéptido seleccionado del grupo consistente de

i) polipéptidos que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 2,

(ii) polipéptidos que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 2,

(iii) polipéptidos codificados por los polinucleótidos de AdipoR2, y

15 (iv) polipéptidos que muestran al menos 99%, 98%, 95%, 90%, u 80% de homología con un polipéptido de (i), (ii), o (iii);

en donde dicho polipéptido tiene una actividad de AdipoR2.

20 Las secuencias de nucleótidos que codifican un AdipoR2 (o su complemento) tienen numerosas aplicaciones en técnicas conocidas por los experimentados en la técnica de la biología molecular. Estas técnicas incluyen el uso de sondas de hibridación, uso en la construcción de oligómeros para PCR, uso para el mapeo de cromosomas y genes, uso en la producción recombinante de AdipoR2, y uso en la generación de ADN o ARN antisentido, sus análogos químicos y similares. El uso de nucleótidos que codifican un AdipoR2 divulgado aquí son ejemplos de técnicas conocidas y no se pretende limitar su uso en cualquier técnica conocida a una persona de experiencia normal en la técnica. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos divulgadas aquí pueden ser utilizadas en técnicas de biología molecular que no hayan sido desarrolladas aún, dado que las nuevas técnicas se basan en propiedades de secuencias de nucleótidos que son conocidas actualmente, por ejemplo, el código genético triplete, interacciones en pares de bases específicos, etc.

25 Será evidente para los experimentados en la técnica que como resultado de la degeneración del código genético, puede producirse una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican AdipoR2. Algunas de estas portarán solamente una mínima homología con la secuencia de nucleótidos de la AdipoR2 conocida y de origen natural. La invención ha contemplado específicamente cada posible variación de secuencias de nucleótidos que podría hacerse seleccionando combinaciones con base en selecciones posibles de codones. Estas combinaciones se hacen de acuerdo con el código genético triplete estándar tal como se aplica a las secuencias de nucleótidos de origen natural AdipoR2, y todas tales variaciones deben considerarse como divulgadas específicamente.

35 Aunque las secuencias de nucleótidos que codifican un AdipoR2, sus derivados o sus variantes son capaces preferiblemente de hibridar a la secuencia del polinucleótido de AdipoR2 de origen natural bajo condiciones restrictivas, puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifiquen polipéptidos de AdipoR2 o sus derivados, que poseen una utilización de codón sustancialmente diferente. Los codones pueden ser seleccionados para incrementar la velocidad a la cual ocurre la expresión del péptido en un huésped de expresión particular procarionte o eucariote de acuerdo con la frecuencia con la cual se utilizan los codones particulares por parte del huésped. Otras razones para alterar sustancialmente la secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido de AdipoR2 y/o sus derivados sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada incluyen la producción de transcritos de ARN que tienen propiedades más deseables, tales como una vida media más larga, que los transcritos producidos a partir de la secuencia de origen natural.

45 Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de AdipoR2 pueden unirse a una variedad de otras secuencias de nucleótidos por medio de técnicas de ADN recombinante bien establecidas. Secuencias de nucleótidos útiles para unirse a polinucleótidos de AdipoR2 incluyen un surtido de vectores de clonación tales como plásmidos, cósmidos, derivados de fago lambda, fagémidos y similares. Vectores de interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, vectores de secuenciamiento, etc. En general, los vectores de interés pueden contener un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios sensibles de endonucleasa de restricción convenientes, y marcadores seleccionables para uno o más sistemas de células huésped.

Esta solicitud describe sondas de hibridación específicas para AdipoR2 capaces de hibridar con secuencias de nucleótidos de origen natural que codifican AdipoR2. Tales sondas pueden ser utilizadas para la detección de secuencias de codificación de GPCR similares y deberían mostrar preferiblemente al menos 40% de identidad en nucleótidos con los polinucleótidos de AdipoR2. Las sondas de hibridación pueden derivarse a partir de la secuencia

5 de nucleótidos presentada como SEQ ID NO: 1 o a partir de secuencias genómicas que incluyen promotores, potenciadores o intrones del gen nativo. Las sondas de hibridación pueden ser marcadas con una variedad de moléculas informadoras utilizando técnicas bien conocidas en el arte.

Se reconocerá que muchos análogos de eliminación o de mutación de los polinucleótidos de AdipoR2 serán sondas de hibridación efectivas para polinucleótidos de AdipoR2.

10 "Condiciones restrictivas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente relacionadas. Por ejemplo, tales condiciones permitirán en general la hibridación de secuencias con al menos 85% de identidad de frecuencia, preferiblemente con al menos 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente con al menos 95% de identidad de secuencia. Las condiciones de hibridación y las sondas pueden ajustarse de maneras bien caracterizadas para alcanzar una hibridación selectiva de sondas derivadas de humano.

15 Las condiciones restrictivas, dentro del significado de la invención son 65° en un regulador que contiene EDTA 1mM, NaHPO<sub>4</sub> 0.5M (pH 7.2) SDS al 7% (p/v).

Las moléculas de ácido nucleico que hibridizan a los polinucleótidos de AdipoR2 bajo condiciones restrictivas pueden identificarse funcionalmente. Sin limitación, ejemplos de los usos para sondas de hibridación incluyen: usos

20 ejemplo para identificar un tipo de tejido de muestra o para identificar células que expresan niveles anormales de AdipoR2; y la detección de polimorfismos de AdipoR2.

La PCR proporciona usos adicionales para oligonucleótidos con base en la secuencia de nucleótidos que codifica AdipoR2. Tales sondas usadas en PCR pueden ser de origen recombinante, sintetizadas químicamente, o una

25 mezcla de ambas. Los oligómeros pueden comprender secuencias de nucleótidos discretas empleadas bajo condiciones optimizadas para la identificación de AdipoR2 en tejidos específicos o en usos diagnósticos. Los mismos dos oligómeros, un conjunto anidado de oligómeros o incluso una reserva degenerada de oligómeros puede emplearse bajo condiciones menos restrictivas para la identificación de ADN o ARN relacionados estrechamente.

Las reglas para designar los cebadores de la reacción de cadena de polimerasa (PCR) se establecen ahora, tal como ha sido revisado por los protocolos de PCR. Los cebadores degenerados, esto es, preparaciones de

30 cebadores que son heterogéneos en localizaciones de secuencia dadas, pueden diseñarse para amplificar las secuencias de ácidos nucleicos que son altamente homólogas a, pero no idénticas a AdipoR2. Hay disponibles ahora estrategias que permiten que solamente uno de los cebadores sea requerido para hibridar específicamente con una secuencia conocida. Por ejemplo, los cebadores de ácidos nucleicos apropiados pueden ser ligados al ácido nucleico cuya amplificación se busca para proveer el asociado de hibridación para uno de los cebadores. De

35 esta manera, solamente uno de los cebadores necesita estar basado en la secuencia de ácido nucleico que se busca amplificar.

Los métodos de PCR para amplificar ácidos nucleicos utilizaran al menos dos cebadores. Uno de estos cebadores será capaz de hibridar una primera cadena del ácido nucleico para ser amplificado y de cebar la síntesis de ácido

40 nucleico guiada por enzimas en una primera dirección. El otro será capaz de hibridar la secuencia recíproca de la primera cadena (si la secuencia que se va amplificar es de cadena sencilla, esa secuencia inicialmente será hipotética, pero será sintetizada en el primer ciclo de amplificación) y de cebar la síntesis de ácidos nucleicos de esa cadena en la dirección opuesta a la primera dirección y hacia el sitio de hibridación para el primer cebador. Las condiciones para llevar a cabo tales amplificaciones, particularmente bajo condiciones de hibridación restrictivas preferidas, son bien conocidas.

45 Otros medios para producir sondas de hibridación específica para AdipoR2 incluyen la clonación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican AdipoR2 o derivados de AdipoR2 en vectores para la producción de sondas de ARNm. Tales vectores son conocidos en la técnica, están disponibles comercialmente y pueden utilizarse para sintetizar sondas de ARN in vitro por medio de la adición de la polimerasa de ARN apropiada como polimerasa T7 o SP6 ARN y las moléculas informadoras apropiadas.

50 Es posible producir una secuencia de ADN, o porciones de la misma, completamente por química sintética. Después de la síntesis, la secuencia de ácidos nucleicos puede ser insertada en cualquiera de los muchos vectores de ADN disponibles y sus respectivas células huésped utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte. Además, puede utilizarse la química sintética para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos. Alternativamente, una porción de secuencia en la cual se desea una mutación puede sintetizarse y recombinarse con una porción más

55 larga de una secuencia genómica o recombinante existente.

Los polinucleótidos de AdipoR2 pueden ser utilizados para producir un oligo o polipéptido purificado utilizando métodos bien conocidos de la tecnología de ADN recombinante. El oligopéptido puede ser expresado en una variedad de células huésped, bien sean procariones o eucariotes. Las células huésped pueden ser de la misma

especie a partir de la cual se derivó la secuencia de nucleótidos o a partir de una especie diferente. Las ventajas de producir un oligonucleótido por tecnología de ADN recombinante incluyen obtener cantidades adecuadas de la proteína para purificación y la disponibilidad de procedimientos de purificación simplificados.

Determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos

- 5 Una etapa importante en el análisis genético molecular de una enfermedad humana es frecuentemente la enumeración del número de copias de ácidos nucleicos o la expresión relativa de un gen en tejidos particulares.

Hay disponibles actualmente varias diferentes metodologías para hacer determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos. Técnicas basadas en cromosomas, tales como hibridación genómica comparativa (CGH) e hibridación fluorescente in situ (FISH) facilitan los esfuerzos para localizar citogenéticamente regiones genómicas que están alteradas en las células tumorales. Las regiones de alteración genómica pueden estrecharse adicionalmente utilizando la pérdida de análisis de heterocigotidad (LOH) en las cuales el ADN de la enfermedad es analizado y comparado con ADN normal en cuanto a la pérdida de un marcador polimórfico heterocigoto. Los primeros experimentos usaron polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP) [de Johnson], (1989), o ADN minisatélite hipervariable [Barnes, 2000]. En años recientes la LOH se ha ejecutado primariamente utilizando amplificación de PCR de marcadores microsátélites y electroforesis de los productos de PCR radio marcados [Jeffreys, (1985)] o marcados con fluorescencia [Weber, (1990)], y por comparación entre ADNs apareados normales y de la enfermedad.

También se ha desarrollado un cierto número de otros métodos para cuantificar ácidos nucleicos [Gergen, (1992)]. Más recientemente, se han desarrollado métodos de PCR y RT-PCR que son capaces de medir la cantidad de un ácido nucleico en una muestra. Una metodología, por ejemplo, mide la cantidad de producto de PCR en la fase logarítmica de la reacción antes de la formación de las mesetas de productos de reacción [Thomas, (1980)].

Una secuencia de genes contenida en todas las muestras, en una cantidad relativamente constante se utiliza típicamente para la normalización de la eficiencia de la amplificación en la muestra. Esta metodología, sin embargo, sufre de varias desventajas. El método requiere que cada muestra tenga cantidades de entrada igual del ácido nucleico y que la eficiencia de la amplificación entre las muestras sea idéntica hasta el tiempo del análisis. Adicionalmente, es difícil utilizar los métodos convencionales de cuantificación de PCR tales como electroforesis en gel o hibridación por captura en placa para determinar que todas las muestras en efecto han sido analizadas durante la fase logarítmica de la reacción tal como se requiere por el método.

Otro método denominado (QC)-PCR cuantitativo competitivo, como lo implica el nombre, se basa en la inclusión de un competidor de control interno en cada reacción [Piatak, (1993) Bio Techniques]. La eficiencia de cada reacción es normalizada al competidor interno. Una cantidad conocida de competidor interno se agrega típicamente a cada muestra. El producto de PCR objetivo desconocido se compara con el producto de PCR competidor conocido para obtener una cuantificación relativa. Una dificultad con esta metodología general yace en el desarrollo de un control interno que amplifique con la misma eficiencia que la molécula objetivo.

### 35 Ensayos de la nucleasa 5' fluorogénica

Los ensayos de la nucleasa fluorogénica son un método de cuantificación en tiempo real que utiliza una sonda para monitorear la formación del producto de amplificación. La base para este método de monitoreo de la formación del producto de amplificación es medir continuamente la acumulación de producto de PCR utilizando una sonda de oligonucleótido fluorogénico de doble marcación, una metodología citada frecuentemente en la literatura simplemente como el "método TaqMan" [Piatak, (1993), Science; Heid, (1996); Gibson, (1996); Holland. (1991)].

La sonda usada en tales pruebas es típicamente un oligonucleótido corto (aproximadamente 20-25 bases) que está marcado con dos pigmentos fluorescentes diferentes. El terminal 5' de la sonda se une a un pigmento informador y el terminal 3' se une a un pigmento de detención, aunque los pigmentos podrían estar unidos en otras localizaciones sobre la sonda también. La sonda está diseñada para tener al menos una secuencia sustancial complementaria con el sitio de enlazamiento de la sonda. Los cebadores de PCR corriente arriba y corriente abajo que se enlazan a las regiones flanqueantes del locus se agregan a la mezcla de reacción. Cuando la sonda está intacta, ocurre la transferencia de energía entre los dos fluoróforos y el detenedor detiene la emisión desde el informador. Durante la fase de extensión de PCR, la sonda es escindida por la actividad de la 5' nucleasa de una polimerasa de ácido nucleico tal como Taq polimerasa, liberando por tanto el informador del detenedor de oligonucleótido y dando como resultado un incremento en la intensidad de emisión del informador la cual puede ser medida mediante un detector apropiado.

Un detector que está adaptado específicamente para medir las emisiones de fluorescencia tales como las creadas durante el ensayo fluorogénico es el ABI 7700 o 4700 HT manufacturado por Applied Biosystems, Inc, en Foster City, California. El ABI 7700 utiliza fibra óptica conectada con cada pozo en una disposición de tubos de PCR de 96 o 384 pozos. El instrumento incluye un láser para excitar los marcadores y es capaz de medir la intensidad de los espectros de fluorescencia de cada tubo con monitoreo continuo durante la amplificación del PCR. Cada tubo se reexamina cada 8.5 segundos.

El software de ordenador provisto con el instrumento es capaz de registrar la intensidad de la fluorescencia del informador y del detenedor durante el curso de la amplificación. Los valores registrados serán utilizados entonces para calcular el incremento en intensidad de emisión del informador normalizada sobre una base continua. El incremento en la intensidad de la emisión se representa en un gráfica versus tiempo, esto es, el número de ciclos de amplificación, para producir una medida continua de la amplificación. Para cuantificar el locus en cada reacción de amplificación, la gráfica de amplificación se examina en un punto durante la fase logarítmica de la acumulación de producto. Esto se logra asignando una intensidad de umbral de fluorescencia por encima de la señal de fondo y determinando el punto en el cual cada curva de amplificación cruza el umbral (definido como el número de ciclo de umbral o Ct). Las diferencias en el número de ciclo de umbral se utilizan para cuantificar la cantidad relativa de PCR objetivo contenida en cada tubo. Asumiendo que cada reacción funciona a una eficiencia de 100% de PCR, una diferencia de un Ct representa una diferencia de dos veces en la cantidad de patrón de inicio. El valor de fluorescencia puede ser utilizado en conjunción con una curva estándar para determinar la cantidad de producto de amplificación presente.

Métodos de detección no basados en sonda

Hay disponible una variedad de opciones para medir los productos de amplificación a medida que se forman. Un método utiliza marcadores, tales como pigmentos, los cuales se enlazan solamente a ADN de cadena doble. Este tipo de metodología, el producto de amplificación (el cual es de cadena doble) se enlaza a moléculas de pigmento en solución para formar un complejo. Con los pigmentos apropiados, es posible distinguir entre moléculas de pigmento libres en solución y moléculas de pigmento enlazadas al producto de amplificación. Por ejemplo, ciertos pigmentos fluorescen solamente cuando se unen al producto de amplificación. Ejemplos de pigmentos que pueden utilizarse en métodos de este tipo general incluyen, pero no se limitan a, verde Syber, TM y Pico Green de Molecular Probes, Inc. of Eugene, Oregón, bromuro de etidio, yoduro de propidio, cromomicina, naranja de acridina, Hoechst 33258, Toto-1, Yoyo-1, DAPI (clorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol).

Otra técnica de detección en tiempo real mide la alteración en la energía de transferencia de la energía de fluorescencia entre fluoróforos conjugados con cebadores de PCR [Livak, (1995)].

Métodos de detección basados en sonda

Estos métodos de detección involucran alguna alteración a la estructura o conformación de una sonda hibridada al locus entre el par cebador de amplificación. En algunos casos, la alteración es causada por una extensión dependiente del patrón catalizada por un ácido nucleico polimerasa durante el proceso de amplificación. La alteración genera una señal detectable la cual es una medición indirecta de la cantidad de producto de amplificación formado.

Por ejemplo, algunos métodos involucran la degradación o digestión de la sonda durante la reacción de extensión. Estos métodos son una consecuencia de la actividad de la 5'-3' nucleasa asociada con algunas polimerasas de ácido nucleico. Las polimerasas que tienen esta actividad escinden mononucleótidos u oligonucleótidos pequeños a partir de una sonda de oligonucleótidos fusionada a su secuencia complementaria localizada dentro del locus.

El extremo 3' del cebador corriente arriba proporciona el sitio de enlazamiento inicial para la ácido nucleico polimerasa, a medida que la polimerasa cataliza la extensión del cebador corriente arriba y encuentra la sonda enlazada, la ácido nucleico polimerasa desplaza una porción del extremo 5' de la sonda y a través de su actividad como nucleasa escinde mononucleótidos u oligonucleótidos de la sonda.

El cebador corriente arriba y la sonda pueden estar diseñados de tal manera que se fusionen con la hebra complementaria en cercana proximidad uno a otro. En efecto, el extremo 3' del cebador corriente arriba del extremo 5' de la sonda pueden empalmarse uno con otro. En esta situación, la extensión del cebador corriente arriba no tiene necesariamente el propósito para la ácido nucleico polimerasa de comenzar la escisión de la sonda. En el caso en el cual los nucleótidos que intervienen separen el cebador corriente arriba y la sonda, la extensión del cebador es necesaria antes de que la ácido nucleico polimerasa encuentre el extremo 5' de la sonda. Una vez ocurre el contacto y continúa la polimerización, la actividad de la 5'-3' exonucleasa de la ácido nucleico polimerasa comienza a escindir mononucleótidos u oligonucleótidos del extremo 5' de la sonda. La digestión de la sonda continúa hasta que la porción remanente de la sonda se disocia de la cadena complementaria.

En solución, las dos secciones de extremo pueden hibridar una con otra para formar un bucle en horquilla. En esta conformación, el pigmento del informador y del detenedor está en proximidad suficientemente cercana de tal manera que la fluorescencia desde el pigmento del informador es detenida efectivamente por el pigmento del detenedor. La sonda hibridada, en contraste, da como resultado una conformación linealizada en la cual el grado de detención disminuye. Así, por cambios en la emisión de monitoreo para los dos pigmentos, es posible monitorear indirectamente la formación del producto de amplificación.

55 Sondas

La sonda marcada se selecciona de tal manera que su secuencia sea sustancialmente complementaria a un segmento del locus de prueba o un locus de referencia. Tal como se indica anteriormente, el sitio del ácido nucleico al cual se enlaza la sonda debería estar localizado entre los sitios de enlazamiento del cebador para los cebadores de amplificación corriente arriba y corriente abajo.

5 Cebadores

Los cebadores utilizados en la amplificación se seleccionan de tal manera que sean capaces de hibridar a secuencias en regiones flanqueantes del locus que está siendo amplificado. Los cebadores se escogen de tal manera que tengan una complementariedad al menos sustancial con las diferentes cadenas del ácido nucleico que está siendo amplificado. Cuando se utiliza una sonda para detectar la formación de productos de amplificación, los cebadores se seleccionan de tal manera que flanquean la sonda, esto es, se localizan corriente arriba y corriente abajo de la sonda.

El cebador debe tener suficiente longitud de tal manera que sea capaz de cebar la síntesis de los productos de extensión en la presencia de un agente de polimerización. La longitud y composición del cebador dependen de muchos parámetros, incluyendo, por ejemplo, la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción de fusión, la proximidad del sitio de enlazamiento de la sonda al del cebador, las concentraciones relativas del cebador y de la sonda y la composición particular del ácido nucleico de la sonda. Típicamente el cebador incluye 15-30 nucleótidos. Sin embargo, la longitud del cebador puede ser más o menos dependiente de la complejidad del sitio de enlazamiento del cebador y de los factores listados más arriba.

Marcadores para sondas y cebadores

Los marcadores utilizados para marcar las sondas o cebadores utilizados en la presente invención y que pueden proveer la señal correspondiente a la cantidad de producto de amplificación pueden tomar una variedad de formas. Como se indicó anteriormente con respecto al método de la nucleasa 5' fluorogénica, una señal fluorescente es una señal que puede ser medida. Sin embargo, las mediciones pueden hacerse también, por ejemplo, por actividad de monitoreo, colorimetría, absorción, parámetros magnéticos o actividad enzimática. Así, los marcadores que pueden ser empleados incluyen, pero no se limitan a, fluoróforos, cromóforos, isotopos radioactivos, reactivos densos en electrones, enzimas, y ligandos que tengan asociados de enlazamiento específicos (por ejemplo, biotina-avidina).

Los cambios de monitoreo en la fluorescencia son una forma particularmente útil para monitorear la acumulación de productos de amplificación. Hay disponible un cierto número de marcadores útiles para enlazamiento a sondas o cebadores incluyendo fluoresceína y varios derivados de la fluoresceína tales como FAM, HEX, TET y JOE (todos los cuales están disponibles en Applied Biosystems, Foster City, California); amarillo de luciferina y derivados de cumarina.

Los marcadores pueden estar unidos a la sonda o al cebador utilizando una variedad de técnicas y pueden unirse en el extremo 5', y/o el extremo 3' y/o en un nucleótido interno. El marcador también puede unirse a brazos espaciadores de diversos tamaños los cuales están unidos a la sonda o cebador. Estos brazos espaciadores son útiles para obtener una distancia deseada entre múltiples marcadores unidos a la sonda o cebador.

En algunos casos, pueden utilizarse un marcador sencillo, mientras tanto, en otros casos, tales como con los ensayos con nucleasa 5' fluorogénica por ejemplo, se unen dos o más marcadores a la sonda. En los casos en donde la sonda incluye marcadores múltiples, es aconsejable en general mantener un espaciamiento entre los marcadores que sea suficiente para permitir la separación de los marcadores durante la digestión de la sonda a través de la actividad de la 5'-3' nucleasa de la ácido nucleico polimerasa.

Pacientes que exhiben síntomas de la enfermedad

Se asocia un cierto número de enfermedades con cambios en el número de copias de un cierto gen. Para pacientes que tienen síntomas de una enfermedad, puede utilizarse el método de PCR en tiempo real para determinar si el paciente tiene alteraciones en el número de copias que sean conocidas por estar relacionadas con enfermedades que a su vez están asociadas con los síntomas que tiene el paciente.

Expresión de AdipoR2

Proteínas de fusión de AdipoR2

Las proteínas de fusión son útiles para generar anticuerpos contra los polipéptidos de AdipoR2 y para uso en diversos sistemas de prueba. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden ser utilizadas para identificar proteínas que interactúen con porciones de polipéptidos de AdipoR2. La cromatografía de afinidad de proteínas o los ensayos basados en biblioteca para interacciones proteína-proteína, tales como los sistemas dos híbridos de levadura o despliegue de fagos, pueden utilizarse para este propósito. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y ambos pueden ser utilizados para la selección de fármacos.

Una proteína de fusión de AdipoR2 comprende dos segmentos de polipéptidos fusionados entre sí por medio de un enlace peptídico. El primer segmento polipeptídico puede comprender al menos 54, 75, 100, 125, 139, 150, 175, 200, 225, 250, o 275 aminoácidos contiguos de SEC ID NO: 2 o una variante biológicamente activa, tal como las descritas anteriormente. El primer segmento de polipéptidos también puede comprender AdipoR2 de longitud completa.

El segundo segmento de polipéptidos puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento de proteína. Las proteínas utilizadas comúnmente en la construcción de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteínas autofluorescentes, incluyendo proteína fluorescente azul (BFP), glutationa-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano (HRP) y cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Adicionalmente se utilizan etiquetas de epítomos en las construcciones de proteínas de fusión, incluyendo etiquetas de histidina (His), etiquetas de FLAG, etiquetas de hemaglutinina de la influenza (HA), etiquetas Myc, etiquetas VSV-G, y etiquetas tiorredoxina (TRX). Otras construcciones de fusión pueden incluir proteína de enlazamiento de maltosa (MBP), etiquetas S, fusiones de Lex, un dominio de enlazamiento de ADN (DBD), fusiones de dominio de enlazamiento GAL4 ADN, fusiones de proteínas de virus de herpes simplex (HSV) BP16 y fusiones de proteína G (por ejemplo G(alfa)16, Gs, Gi). También puede manipularse una proteína de fusión para que contenga un sitio de escisión localizado adyacente a la AdipoR2.

#### Preparación de polinucleótidos

Un polinucleótido de AdipoR2 de origen natural puede aislarse libre de otros componentes celulares tales como componentes de membranas, proteínas y lípidos. Los polinucleótidos pueden hacerse mediante una célula y aislarse utilizando técnicas de purificación de ácidos nucleicos estándar, o sintetizarse utilizando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), o utilizando un sintetizador automático. Los métodos para aislar polinucleótidos son de rutina y bien conocidos en la técnica. Cualquier técnica tal para obtener un polinucleótido puede utilizarse para obtener polinucleótidos de AdipoR2 aislados. Por ejemplo, pueden utilizarse enzimas y sondas de restricción para aislar fragmentos de polinucleótidos que comprendan secuencias de nucleótidos de AdipoR2. Los polinucleótidos aislados están en preparaciones que están libres o al menos 70, 80, o 90% libres de otras moléculas.

Las moléculas de ADNc de AdipoR2 pueden hacerse con técnicas de biología molecular estándar, utilizando ARNm de AdipoR2 como patrón. Las moléculas de ADNc de AdipoR2 pueden después de esto ser replicadas utilizando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica. Una técnica de amplificación, tal como PCR, puede utilizarse para obtener copias adicionales utilizando bien sea ADN o ADNc genómico humano como patrón.

Alternativamente, pueden utilizarse técnicas de química sintética para sintetizar polinucleótidos de AdipoR2. La degeneración del código genético permite que secuencias de nucleótidos alternas sean sintetizadas, las cuales codificarán AdipoR2 que tiene, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 o una variante biológicamente activa del mismo.

#### Polinucleótidos de extensión

Pueden utilizarse diversos métodos basados en PCR para extender las secuencias de ácidos nucleicos que codifican AdipoR2 humano, por ejemplo para detectar secuencias corriente arriba del gen de AdipoR2 tales como elementos promotores y reguladores. Por ejemplo, la PCR de sitio de restricción utiliza cebadores universales para recuperar secuencias desconocidas adyacentes a un locus conocido. El ADN genómico se amplifica primero en la presencia de un cebador a una secuencia de enlazamiento y un cebador específico a la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten entonces a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador de enlace y otro cebador específico interno al primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada y se secuencian utilizando transcriptasa reversa.

También puede utilizarse PCR inverso para amplificar o extender secuencias utilizando cebadores divergentes con base en una región conocida. Los cebadores pueden diseñarse utilizando software disponible comercialmente, tal como el software OLIGO 4.06 Primer Analysis (Nacional Biosciences Inc., Plymouth, MN), para tener de 22-30 nucleótidos de longitud, tener un contenido de GC de 50% o más, y para fusionarse con la secuencia objetivo a temperaturas por encima de 68-72°C. Este método utiliza varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento se convierte entonces en circular por ligación intramolecular y se utiliza como un patrón para PCR.

Otro método que puede ser utilizado es la captura de PCR, la cual involucra la amplificación de PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en humanos y un ADN de cromosoma artificial de levadura. En este método, pueden usarse también digestiones con enzimas de restricción múltiple y ligaciones para colocar una secuencia de doble cadena manipulada en un fragmento desconocido de la molécula de ADN antes de llevar a cabo el PCR.

Cuando se seleccionan ADNc de longitud completa, es preferible utilizar bibliotecas que hayan sido seleccionadas para incluir ADNsc más grande. Son preferibles bibliotecas cebadas aleatoriamente, puesto que contienen más

secuencias que contienen las regiones 5' de los genes. El uso de una biblioteca cebada aleatoriamente puede ser preferible especialmente para situaciones en las cuales una biblioteca de oligo d(T) no produzca un ADNc de longitud completa. Las bibliotecas genómicas pueden ser útiles para la extensión de la secuencia en regiones reguladoras 5' no transcritas.

- 5 Los sistemas de electroforesis capilar disponibles comercialmente pueden ser utilizados para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de los productos de PCR o de secuenciación. Por ejemplo, la secuenciación capilar puede emplear polímeros que fluyen para la separación electroforética, cuatro pigmentos fluorescentes diferentes (uno para cada nucleótido) que se activan por láser, y la detección de las longitudes de onda emitidas mediante una cámara de un dispositivo de carga acoplado. La intensidad de salida/luz puede ser convertida en señal eléctrica utilizando equipo y software apropiado (por ejemplo, el GENOTYPER y el Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), y el proceso completo para cargar las muestras para el análisis por ordenador y la presentación de datos electrónicos puede ser controlada por ordenador. La electroforesis capilar es especialmente preferible para el secuenciamiento de pequeñas piezas de ADN las cuales podrían estar presentes en cantidades limitadas en una muestra particular.

15 Obtención de polipéptidos

La AdipoR2 puede ser obtenida, por ejemplo, por purificación a partir de células humanas, por expresión de polinucleótidos de AdipoR2, o por síntesis química directa.

Purificación de proteínas

- 20 La AdipoR2 puede ser purificada a partir de cualquier célula humana que exprese el receptor, incluyendo aquellas que han sido transfectadas con constructos de expresión que expresan AdipoR2. Una AdipoR2 purificada es separada de otros compuestos los cuales, normalmente se asocian con la AdipoR2 en la célula, tales como ciertas proteínas, carbohidratos o lípidos, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis preparativa en gel.

25 Expresión de polinucleótidos de AdipoR2

- 30 Para expresar la AdipoR2, los polinucleótidos de AdipoR2 pueden ser insertados en un vector de expresión que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Los métodos que son bien conocidos para los experimentados en la técnica pueden ser utilizados para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican AdipoR2 y elementos de control transcripcionales y de traducción apropiado. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo.

- 35 Puede utilizarse una variedad de sistemas de expresión vector/huésped para contener y expresar las secuencias que codifican la AdipoR2. Estas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, plásmido o cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura, sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus), sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus mosaico de la coliflor, CaMV; virus mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322), o sistemas de células animales.

- 40 Los elementos de control o secuencias reguladoras son aquellas regiones no traducidas del vector - potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3' - que interactúan con proteínas celulares huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su resistencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado, puede usarse cualquier número de elementos adecuados de transcripción y traducción, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se hace clonación en sistemas bacterianos, pueden utilizarse promotores inducibles tales como el promotor híbrido lacZ del fagémido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, California) o el plásmido pSPORT1 (Life Technologies) y similares. El promotor polihedrina de baculovirus puede utilizarse en células de insecto. Promotores o potenciadores derivados de los genomas de células vegetales (por ejemplo, choque por calor, RUBISCO y genes de proteínas de almacenamiento) o de virus de plantas (por ejemplo, promotores virales o secuencias de guía) pueden clonarse en el vector. En sistemas de células de mamíferos, son preferibles promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Es necesario generar una línea celular que contenga copias múltiples de una secuencia de nucleótidos que codifique AdipoR2, pueden usarse vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

Sistemas de expresión bacterianos y en levadura

- 55 En sistemas bacterianos, puede seleccionarse un cierto número de vectores de expresión. Por ejemplo, cuando se requiere de una gran cantidad de AdipoR2 para la inducción de anticuerpos, pueden usarse los vectores que dirigen la expresión a alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, clonación de E. coli multifuncional y vectores de expresión tales como BLUESCRIPT (Stratagene). En un

vector BLUESCRIPT, puede ligarse una secuencia que codifica AdipoR2 en el vector en marco con secuencias para el Met aminoterminal y los subsecuentes residuos 7 de  $\beta$ -galactosidasa de tal manera que se produce una proteína híbrida. Los vectores pIN o los vectores pGEX (Promega, Madison, Wisconsin) también pueden ser utilizados para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células sometidas a lisis por adsorción a perlas de glutatona-agarosa seguida por elución en la presencia de glutatona libre. Las proteínas hechas en tales sistemas pueden diseñarse para que incluyan heparina, trombina, o sitios de escisión del factor Xa proteasa de tal manera que el polipéptido clonado de interés pueda ser liberado de la unidad estructural GST según se desee.

#### Sistemas de expresión en plantas e insectos

- 10 Si se utilizan vectores de expresión en plantas, la expresión de las secuencias que codifican AdipoR2 puede ser guiada por cualquiera de un cierto número de promotores. Por ejemplo, los promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV pueden utilizarse solos o en combinación con la secuencia guía omega de TMV. Alternativamente, pueden usarse los promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o los promotores de choque por calor. Estos constructos pueden ser introducidos en células vegetales por transformación directa de ADN o por transfección mediada por patógenos.

- 15 Un sistema de insectos también puede ser utilizado para expresar AdipoR2. Por ejemplo, en tal sistema, el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se utiliza como vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en *Trichoplusia larvae*. Las secuencias que codifican AdipoR2 pueden ser clonadas en una región no esencial del virus, tal como el gen polihedrina, y colocadas bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa de la AdipoR2 producirá el gen de polihedrina inactivo y producirá el virus recombinante que carece de proteína de cubrimiento. Los virus recombinantes pueden ser utilizados entonces para infectar células de *S. frugiperda* o *Trichoplusia larvae* en los cuales puede expresarse la AdipoR2.

#### Sistemas de expresión de mamíferos

- 25 Puede utilizarse un cierto número de sistemas de expresión con base en virus para expresar AdipoR2 en células huésped de mamíferos. Por ejemplo, si se utiliza un adenovirus como factor de expresión, las secuencias que codifican AdipoR2 pueden ligarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que comprende el último promotor y una secuencia de guía tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico puede ser utilizada para obtener un virus viable que sea capaz de expresar AdipoR2 en células huésped infectadas [Engelhard, 1994]. Si se desea, pueden utilizarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus de sarcoma de Rous (RSV) para incrementar la expresión en células huésped de mamíferos.

- 30 Los cromosomas humanos artificiales (HAC) también pueden ser utilizados para producir fragmentos más grandes de ADN que puedan ser contenidos y expresados en un plásmido. Se construyen HAC de 6M a 10M y se suministran a células a través de métodos de administración convencionales (por ejemplo, liposomas, aminopolímeros catiónicos, o vesículos). También pueden utilizarse señales de iniciación específicas para alcanzar una traducción más eficiente de secuencias que codifican AdipoR2. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En casos donde las secuencias que codifican AdipoR2, su codón de iniciación y secuencias corrientes arriba se inserten en el vector de expresión apropiado, pueden no necesitarse señales de control de transcripción o traducción adicionales. Sin embargo, en casos donde se inserta solamente la secuencia de codificación o un fragmento de la misma, deben proveerse señales de control de traducción exógenas (incluyendo el codón de iniciación ATG). El codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar una traducción del inserto completo. Los elementos de traducción exógenos y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos.

#### Células huésped

- 45 Una célula huésped puede ser escogida por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la AdipoR2 expresada en la forma deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraducción que escinde una forma "prepro" del polipéptido también puede utilizarse para facilitar la inserción, plegado y/o función correcta. Diferentes células huésped que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para actividades postraducción (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, y WI38), están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 -2209) y puede escogerse para asegurar una modificación y procesamiento correctos de la proteína foránea.

- 50 La expresión estable es preferida para la producción a largo plazo, con alto rendimiento, de proteínas recombinantes. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de manera estable el AdipoR2 pueden transformarse utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable sobre el mismo o en un vector separado. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que sean transferidas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan exitosamente las secuencias de AdipoR2

introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de manera estable pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas al tipo de célula. Cualquier número de sistemas de selección puede ser utilizado para recuperar las líneas celulares transformadas. Estas incluyen, pero no se limitan, a los genes de timidina quinasa de virus de herpes simplex [Logan, (1984)] y a la adenina fosforribosiltransferasa [Wigler, (1977)] los cuales pueden emplearse en células tk<sup>-</sup> o apr<sup>t</sup>, respectivamente. También, puede utilizarse la resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como base para la selección. Por ejemplo la *dhfr* confiere resistencia al metotrexato [Lowy, (1980)], la *npt* confiere resistencia a los aminoglicósidos, neomicina y G-418 [Wigler, (1980)], y *als* y *pat* confieren resistencia a clorosulfurón y fosfinitricín acetiltransferasa, respectivamente [Colbere-Garapin, 1981]. Se han descrito genes seleccionables adicionales. Por ejemplo, el *trpB* permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o *hisD*, lo cual permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina. Pueden utilizarse marcadores visibles tales como antocianinas, β-glucuronidasa y su sustrato GUS y luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar transformantes y para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transiente o estable atribuible a un sistema vector específico.

#### Detección de la expresión de polipéptido

Aunque la presencia de la expresión del gen marcador sugiere que el polinucleótido de AdipoR2 está también presente, su presencia y expresión puede necesitar confirmación. Por ejemplo, si la secuencia que codifica AdipoR2 se inserta dentro de una secuencia de marcador genético, las células transformadas que contienen secuencias que codifican AdipoR2 pueden identificarse mediante la ausencia de la función del gen marcador. Alternativamente, un gen marcador puede colocarse en tándem con una secuencia que codifica AdipoR2 bajo el control de un promotor sencillo. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica usualmente la expresión del polinucleótido de AdipoR2.

Alternativamente, las células huésped que contienen un polinucleótido de AdipoR2 y que expresan AdipoR2 pueden ser identificadas por una variedad de procedimientos conocidos para los experimentados en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hibridaciones ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayo o inmunoensayo de proteínas, las cuales incluyen tecnologías en membrana, solución o basadas en chips para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, la presencia de una secuencia de polinucleótidos que codifica AdipoR2 puede ser detectada por hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN o amplificación utilizando sondas o fragmentos de polinucleótidos que codifican AdipoR2. Los ensayos de ácido nucleico basados en amplificación involucran el uso de oligonucleótidos seleccionados de secuencias que codifican AdipoR2 para detectar transformantes que contienen un polinucleótido de AdipoR2.

Una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de AdipoR2, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido, es conocida en la técnica. Ejemplos incluyen ensayo inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y selección de células activadas por fluorescencia (FACS). Puede utilizarse un inmunoensayo en dos sitios, basado en monoclonales utilizando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos no interferentes sobre la AdipoR2, o puede emplearse un ensayo de enlazamiento competitivo.

Una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación son conocidas por aquellos experimentados en la técnica y puede utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para la producir hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos que codifican AdipoR2 incluyen oligomarcación, traducción de muesca, marcación terminal o amplificación por PCR utilizando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias que codifican AdipoR2 pueden ser clonadas en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores son conocidos en la técnica, están disponibles comercialmente y pueden utilizarse para sintetizar sondas de ARN in vitro por adición de nucleótidos marcados y una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3, o SP6. Estos procedimientos pueden ser llevados a cabo utilizando una variedad de kits disponibles comercialmente (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, y US Biochemical). Moléculas informadoras o marcadores adecuados que pueden ser utilizados para facilitar la detección incluyen radionúclidos, enzimas y agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

#### Expresión y purificación de polipéptidos

Las células huésped transformadas con polinucleótidos de AdipoR2 pueden cultivarse bajo condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. El polipéptido producido por una célula transformada puede ser secretado o contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usados. Tal como lo entenderán las personas experimentadas en la técnica, los vectores de expresión que contienen los polinucleótidos de AdipoR2 pueden diseñarse para contener secuencias de señal que dirijan la secreción del AdipoR2 soluble a través de una membrana celular procarionta o eucariota o que dirijan la inserción en membrana del AdipoR2 enlazado a la membrana.

Como se discutió anteriormente, pueden utilizarse otras construcciones para unir una secuencia que codifica AdipoR2 a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptidos el cual facilitará la purificación de proteínas solubles. Tales dominios de facilitación de la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos que

forman quelatos con metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Washington). La inclusión de secuencias enlazantes escindibles tales como las específicas para el Factor Xa o la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, California), entre el dominio de purificación y la AdipoR2 también pueden utilizarse para facilitar la purificación. Un tal vector de expresión provee la expresión de una proteína de fusión que contiene AdipoR2 y residuos de 6 histidina precedentes a una tiorredoxina o un sitio de escisión de enteroquinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación por IMAC (cromatografía de afinidad iónica con inmovilización en metal) Maddox, (1983)], mientras que el sitio de escisión de la enteroquinasa proporciona un medio para purificar la AdipoR2 de la proteína de fusión [Porath, (1992)].

#### Síntesis Química

Las secuencias que codifican AdipoR2 pueden ser sintetizadas, en todo o en parte, utilizando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, la AdipoR2 por sí mismo puede ser producido utilizando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tales como por síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida. La síntesis de proteína también puede ser ejecutada utilizando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede ser lograda, por ejemplo, utilizando el Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Opcionalmente, los fragmentos de AdipoR2 pueden ser sintetizados separadamente y combinados utilizando métodos químicos para producir una molécula de longitud completa.

El péptido recién sintetizado puede ser purificado sustancialmente por cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa. La composición de una AdipoR2 sintética puede ser confirmada por análisis o secuenciamiento de aminoácidos. Adicionalmente, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos de AdipoR2 puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinada utilizando métodos químicos con secuencias de otras proteínas para producir una variante de polipéptido o una proteína de fusión.

#### Producción de polipéptidos alterados

Se entenderá por aquellos experimentados en la técnica, que puede ser ventajoso producir polinucleótidos de AdipoR2 que poseen codones de origen no natural. Por ejemplo, los codones preferidos por un huésped procarionota o eucariota en particular pueden seleccionarse para incrementar la velocidad de expresión de proteínas o para producir un transcripto de ARN que tenga propiedades deseables, tales como una vida media que sea más larga que la de un transcripto generado a partir de la secuencia de origen natural.

Las secuencias de nucleótidos citadas aquí pueden ser manipuladas utilizando métodos conocidos generalmente en la técnica para alterar los polinucleótidos de AdipoR2 por una variedad de razones, incluyendo, pero no limitándose a, alteraciones que modifiquen la clonación, procesamiento y/o expresión del polipéptido o producto de ARNm. La redistribución de ADN por fragmentación aleatoria y reensamblaje por PCR de fragmentos de gen y oligonucleótidos sintéticos puede utilizarse para manipular las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, puede utilizarse la mutagénesis dirigida a un sitio para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar preferencias de codón, producir variantes de seccionamiento, introducir mutaciones y así sucesivamente.

#### Anticuerpos

Cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica puede generarse para enlazarse específicamente a un epítipo de AdipoR2.

"Anticuerpo" tal como se utiliza aquí incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, que son capaces de enlazar un epítipo de AdipoR2. Típicamente, se requieren al menos 6, 8, 10, o 12 aminoácidos contiguos para formar un epítipo. Sin embargo, los epítopos que incluyen aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25, o 50 aminoácidos. Un anticuerpo que se enlaza específicamente a un epítipo de AdipoR2 puede utilizarse terapéuticamente, así como en ensayos inmunológicos, tales como inmunoprecipitación Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunológicos conocidos en la técnica. Pueden utilizarse diversos inmunoensayos para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para enlazamiento competitivo o ensayos inmunoradiométricos son bien conocidos en la técnica. Tales inmunoensayos involucran típicamente la medición de la formación de complejos entre un inmunógeno y un anticuerpo que se enlaza específicamente al inmunógeno de AdipoR2.

Típicamente, un anticuerpo que se enlace específicamente a AdipoR2 provee una señal de detección al menos 5-, 10-, o 20- veces más alta que una señal de detección provista con otras proteínas cuando se utiliza en un ensayo inmunológico. Preferiblemente, los anticuerpos que se enlazan específicamente a AdipoR2 no detectan otras proteínas en ensayos inmunológicos y puede inmunoprecipitar la AdipoR2 desde la solución.

La AdipoR2 puede ser utilizada para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobaya, mono o humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, la AdipoR2 puede ser conjugada a una proteína

portadora, tal como albúmina de suero bovino, tiroglobulina, y hemocianina de lapa. Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), y sustancias con actividad superficial (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa y dinitrofenol). Entre los adyuvantes utilizados en humanos, el BCG (bacilos *Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

Los anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a AdipoR2 pueden prepararse utilizando una técnica que provee la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de células B humanas, y la técnica del hibridoma EBV [Roberge, (1995)].

Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el seccionamiento de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con una especificidad y actividad biológica apropiadas. Los anticuerpos monoclonales y otros pueden ser "humanizados" para evitar que un paciente genere una respuesta inmune contra el anticuerpo cuando se usa terapéuticamente. Tales anticuerpos pueden ser suficientemente similares en secuencia a los anticuerpos humanos que se van a utilizar directamente en terapia o pueden requerir la alteración de unos pocos residuos clave. Las diferencias de secuencia entre anticuerpos de roedores y secuencias humanas pueden minimizarse reemplazando residuos que difieren de aquellos en las secuencias humanas por mutagénesis dirigida al sitio de residuos individuales o tamizando las regiones determinantes de complementariedad completa. Los anticuerpos que se enlazan específicamente a AdipoR2 pueden contener sitios de enlazamiento a antígeno que son parcial o completamente humanizados, tal como se describe en U.S. 5,565,332.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden ser adaptadas utilizando métodos conocidos en la técnica para producir anticuerpos de cadena sencilla que se enlazan específicamente a AdipoR2. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de composición idiotípica distinguible, pueden generarse por distribución de cadena a partir de bibliotecas de inmunoglobulina combinatorias aleatorias. Los anticuerpos de cadena sencilla también pueden ser construidos utilizando un método de amplificación de ADN, tales como PCR, utilizando ADNc de hibridoma como patrón. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser mono o biespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. Se enseña la construcción de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos tetravalentes. Una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de cadena sencilla puede construirse utilizando síntesis de nucleótidos manual o automatizada, clonados en un constructo de expresión utilizando métodos de ADN recombinante estándar, e introducirse en una célula para expresar la secuencia de codificación, tal como se describe más adelante. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos de cadena sencilla directamente usando, por ejemplo, tecnología de fago filamentoso.

Los anticuerpos que se enlazan específicamente a AdipoR2 también pueden ser producidos induciendo la producción in vivo de la población de linfocitos o seleccionando bibliotecas o paneles de inmunoglobulina de reactivos de enlazamiento altamente específicos. Pueden construirse otros tipos de anticuerpos y usarse terapéuticamente. Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos quiméricos tal como se divulga en WO 93/03151. También pueden prepararse proteínas de enlazamiento que se derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multiespecíficas, tales como los "diacuerpos" descrito en WO 94/13804.

Los anticuerpos pueden ser purificados por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser purificados por afinidad haciéndolos pasar a través de una columna a la cual está enlazada la AdipoR2. Los anticuerpos enlazados pueden entonces ser eluidos de la columna utilizando un regulador con una alta concentración de sal.

#### 45 Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido son secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica. Una vez introducidos en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con las secuencias naturales producidas por la célula para formar complejos y bloquear bien sea la transcripción o la traducción. Preferiblemente, un oligonucleótido antisentido tiene al menos 11 nucleótidos de longitud, pero puede tener al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 o más nucleótidos de longitud. También pueden utilizarse secuencias más largas. Las moléculas de oligonucleótidos antisentido pueden proveerse en un constructo de ADN e introducirse en una célula tal como se describió anteriormente para hacer disminuir el nivel de productos genéticos de AdipoR2 en la célula.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o una combinación de ambos. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse manualmente o mediante un sintetizador automático, enlazando covalentemente el extremo 5' de un nucleótido con el extremo 3' de otro nucleótido con uniones internucleótidos no fosfodiéster tales como alquilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquilfosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforamidatos, ésteres de fosfato, carbamatos, acetamidato, ésteres de carboximetilo, carbonatos y triésteres de fosfato.

Las modificaciones de la expresión genética de AdipoR2 pueden obtenerse diseñando oligonucleótidos antisentido los cuales formarán dúplex en las regiones de control, 5' o reguladoras del gen de AdipoR2. Los oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de inicio, son los preferidos. De la misma forma, puede alcanzarse la inhibición utilizando la metodología de apareado de bases de "hélice triple". El apareamiento de hélice triple es útil porque produce la inhibición de la capacidad de la hélice doble para abrirse suficientemente para el enlazamiento de las polimerasas, factores de transcripción o chaperonas. Los avances terapéuticos que utilizan el ADN triplex han sido descritos en la literatura [Nicholls, (1993)]. Un oligonucleótido antisentido también puede ser diseñado para bloquear la traducción del ARNm previniendo la transcripción desde el enlazamiento a los ribosomas.

La complementariedad precisa no es requerida para una formación exitosa de complejos entre un oligonucleótido antisentido y la secuencia complementaria de un polinucleótido de AdipoR2. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5 o más alargamientos de nucleótidos contiguos que son precisamente complementarios a un polinucleótido de AdipoR2, separado cada uno por un alargamiento de nucleótidos contiguos que no son complementarios a los nucleótidos de AdipoR2, pueden proveer suficiente especificidad de objetivo para ARNm de AdipoR2. Preferiblemente, cada alargamiento de nucleótidos contiguos complementarios tiene al menos 4, 5, 6, 7, 8 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias de intervención no complementarias tienen preferiblemente 1, 2, 3, o 4 nucleótidos de longitud. Una persona experimentada en la técnica puede usar fácilmente el punto de fusión calculado de un par antisentido-sentido para determinar el grado de discordancia el cual será tolerado entre un oligonucleótido en antisentido particular y una secuencia de polinucleótidos de AdipoR2 en particular. Los oligonucleótidos antisentido pueden modificarse sin afectar su capacidad para hibridar el polinucleótido de AdipoR2. Estas modificaciones pueden ser internas o en uno o ambos extremos de la molécula antisentido. Por ejemplo, los enlaces internucleósido de fosfato pueden modificarse agregando unidades estructurales colesterilo o diamina con números variables de residuos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. Las bases y/o azúcares modificados, tales como arabinosa en vez de ribosa, o un oligonucleótido sustituido en 3', 5' en el cual el grupo 3'-hidroxilo o el grupo fosfato 5' también están sustituidos, pueden ser empleados también en un oligonucleótido antisentido modificado. Estos oligonucleótidos modificados pueden ser preparados por métodos bien conocidos en la técnica.

#### Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica [Uhlmann, (1987)]. Las ribozimas pueden ser utilizadas para inhibir la función genética escindiendo una secuencia de ARN, como es conocida en la técnica. El mecanismo de la acción de las ribozimas involucra la hibridación específica para la secuencia de la molécula de ribozima al ARN objetivo complementario, seguida por escisión endonucleolítica. Ejemplos incluyen moléculas de ribozima de estructura de cabeza de martillo manipuladas que pueden catalizar específica y eficientemente la escisión endonucleolítica de secuencias de nucleótidos específicas. La secuencia de codificación de un polinucleótido de AdipoR2 puede ser utilizada para generar ribozimas que se enlazan específicamente a ARNm transcrito a partir de un polinucleótido de AdipoR2. Los métodos para diseño y construcción de ribozimas que pueden escindir otras moléculas de ARN en trans en una forma altamente específica para la secuencia han sido desarrollados y descritos en la técnica. Por ejemplo, la actividad de escisión de las ribozimas puede ser dirigida a ARN específico manipulando una región de "hibridación" discreta en la ribozima. La región de hibridación contiene una secuencia complementaria al ARN objetivo y así específicamente hibrida con el ARN objetivo.

Sitios de escisión específicos para ribozima dentro de un ARN objetivo de AdipoR2 pueden identificarse barriendo la molécula objetivo en búsqueda de sitios de escisión con ribozima que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, las secuencias de ARN cortas de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del ARN objetivo que contienen el sitio de escisión pueden evaluarse en cuanto a características estructurales secundarias que pueden hacer inoperable el objetivo. La adecuación de los objetivos de ARN de AdipoR2 candidatos también puede evaluarse probando la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios utilizando ensayos de protección a ribonucleasa. Las secuencias de nucleótidos mostrados en SEQ ID NO: 1 y su complemento proveen fuentes de secuencias de regiones de hibridación adecuadas. Secuencias complementarias más largas pueden usarse para incrementar la afinidad de la secuencia de hibridación para el objetivo. Las regiones de hibridación y escisión del ribosoma pueden estar relacionadas integralmente de tal forma que al hibridar el ARN objetivo a través de las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima puede escindir el objetivo.

Las ribozimas pueden ser introducidas en células como parte de un constructo de ADN. Pueden utilizarse métodos mecánicos, tales como microinyección, transfección mediada por liposomas, electroporación, o precipitación con fosfato de calcio para introducir un constructo de ADN que contiene ribozima en células en las cuales se desea hacer disminuir la expresión de AdipoR2. Alternativamente, si se desea que las células retengan de manera estable el constructo de ADN, el constructo puede ser suministrado sobre un plásmido y mantenido como un elemento separado o integrado en el genoma de las células, tal como se conoce en la técnica. Un constructo de ADN que codifica ribozimas puede incluir elementos reguladores transcripcionales tales como un elemento promotor, un elemento potenciador o UAS, y una señal terminadora de la transcripción para controlar la transcripción de las ribozimas en las células (U.S. 5,641,673). Las ribozimas también pueden ser manipuladas para proveer un nivel

adicional de regulación, de tal forma que la destrucción de ARNm ocurra solamente cuando se inducen tanto una ribozima como un gen objetivo en las células.

Selección/ensayos de selección

Reguladores

5 Los reguladores tal como se utilizan aquí, se refieren a compuestos que afectan a la actividad de AdipoR2 in vivo y/o in vivo. Los reguladores pueden ser agonistas y antagonistas de un polipéptido de AdipoR2 y pueden ser compuestos que ejerzan su efecto sobre la actividad de AdipoR2 a través de la expresión, a través de modificaciones post-traducción o por otros medios. Los agonistas de AdipoR2 son moléculas que, cuando se enlazan a AdipoR2, incrementan o prolongan la actividad de AdipoR2. Los agonistas de AdipoR2 incluyen proteínas, 10 ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas pequeñas, o cualquier otra molécula que active el AdipoR2. Los antagonistas de AdipoR2 son moléculas que, cuando se enlazan a AdipoR2, hacen disminuir la cantidad o la duración de la actividad de AdipoR2. Los antagonistas incluyen proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, anticuerpos, moléculas pequeñas o cualquier otra molécula que haga disminuir la actividad de AdipoR2.

15 El término "modular", tal como aparece aquí, se refiere a un cambio en la actividad del polipéptido de AdipoR2. Por ejemplo, la modulación puede producir un incremento o un descenso en la actividad de la proteína, características de enlazamiento o cualquier otra propiedad biológica, funcional o inmunológica de AdipoR2.

20 Tal como se utilizan aquí, los términos "enlazamiento específico" o "enlazando específicamente" se refieren a una interacción entre una proteína o un péptido y un agonista, un anticuerpo o un antagonista. La interacción depende de la presencia de una estructura particular de la proteína reconocida por la molécula de enlazamiento (esto es, el determinante antigénico o epítipo). Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo "A" la presencia de un polipéptido que contenga el epítipo A, o la presencia de A no marcado libre, en una reacción que contiene A marcado libre y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado que se enlaza al anticuerpo.

25 De aquí en adelante se describen métodos (también denominados aquí como "ensayos de selección") para identificar compuestos que pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, enfermedades dermatológicas, enfermedades gastroenterológicas, cáncer, enfermedades hematológicas, enfermedades respiratorias, inflamación, enfermedades neurológicas, enfermedades urológicas. Los métodos persiguen la identificación de candidatos o compuestos de prueba o agentes (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otras moléculas) que se enlazan a AdipoR2 y/o tienen un efecto 30 estimulador o inhibidor sobre la actividad biológica de AdipoR2 o su expresión y luego la determinación de cuáles de estos compuestos tienen un efecto sobre los síntomas o enfermedades relacionadas con enfermedades cardiovasculares, enfermedades dermatológicas, enfermedades gastroenterológicas, cáncer, enfermedades hematológicas, enfermedades respiratorias, inflamación, enfermedades neurológicas, enfermedades urológicas, en un ensayo in vivo.

35 Los compuestos candidatos o de prueba o agentes que se enlazan a AdipoR2 y/o tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad o la expresión de AdipoR2 se identifican bien sea en ensayos que emplean células que expresan AdipoR2 sobre la superficie celular (ensayos basados en células) o en ensayos con AdipoR2 aislados (ensayos libres de células). Los diversos ensayos pueden emplear una variedad de variantes de AdipoR2 (por ejemplo, AdipoR2 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de AdipoR2, o una proteína de fusión que incluye toda o una porción de AdipoR2). Además, AdipoR2 puede ser derivado a partir de cualquier especie de mamífero adecuada (por ejemplo, AdipoR2 de humano, AdipoR2 de rata o AdipoR2 murínico). El ensayo puede ser un ensayo de enlazamiento que se encamina a la medición directa o indirecta del enlazamiento de un compuesto de prueba o de un ligando conocido de AdipoR2 a AdipoR2. El ensayo también puede ser un ensayo de actividad que se encamina a la medición directa o indirecta de la actividad de AdipoR2. El ensayo también puede ser un ensayo de expresión que se encamina a la medición directa o indirecta de la expresión de ARNm de AdipoR2 o proteína de AdipoR2. Los diversos ensayos de selección se combinan con un ensayo in vivo que se encamina a medir el efecto 45 de los compuestos de pruebas sobre los síntomas de las enfermedades cardiovasculares, enfermedades dermatológicas, enfermedades gastroenterológicas, cáncer, enfermedades hematológicas, enfermedades respiratorias, inflamación, enfermedades neurológicas, enfermedades urológicas.

50 En una realización, la aplicación describe ensayos para seleccionar compuestos candidatos o de prueba que se enlazan o modulan la actividad de una forma de AdipoR2 enlazada a la membrana (expresada en la superficie celular). Tales ensayos pueden emplear AdipoR2 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de AdipoR2, o una proteína de fusión que incluye todo o una porción de AdipoR2. Como se describe en mayor detalle más adelante, el compuesto de prueba puede ser obtenido de cualquier manera adecuada, por ejemplo, a partir de bibliotecas de compuestos convencionales. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para enlazarse a una forma enlazada a la membrana del AdipoR2 puede lograrse, por ejemplo, acoplando el compuesto de prueba con un marcador de radioisótopo o enzimático tal como el enlazamiento del compuesto de prueba a la célula que expresa la AdipoR2 que puede medirse por la detección del compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, el compuesto de prueba puede ser marcado con  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , o  $^3\text{H}$ , bien sea directa o indirectamente y el radioisótopo detectado por el recuento directo de la radioemisión o por recuento de centelleo. Alternativamente, el 55

compuesto de prueba puede ser marcado enzimáticamente por ejemplo, con peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, o luciferasa y el marcador enzimático puede ser detectado por la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

5 En un formato de enlazamiento competitivo, el ensayo comprende poner en contacto células que expresan AdipoR2 con un compuesto conocido que se enlace a AdipoR2 para formar una mezcla de ensayo, poniendo en contacto la mezcla de ensayo con el compuesto de prueba, y determinando la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con la célula que expresa AdipoR2, en donde la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con la célula que expresa AdipoR2 comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para enlazarse preferencialmente a la célula que expresa AdipoR2 en comparación con el compuesto conocido.

10 En otra realización, el ensayo es un ensayo basado en células que comprende poner en contacto una célula que exprese una forma de enlazada a la membrana de AdipoR2 (por ejemplo, AdipoR2 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de AdipoR2, o una proteína de fusión que incluya todo o una porción de AdipoR2) expresado sobre la superficie celular con un compuesto de prueba y determinando la capacidad del compuesto de prueba para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la capacidad de la forma enlazada a la membrana de AdipoR2. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de la forma enlazada a la membrana de AdipoR2 puede lograrse por cualquier método por adecuado para medir la actividad de AdipoR2, por ejemplo, cualquier método adecuado para medir la actividad de un receptor acoplado a proteína G u otro receptor de transmembrana siete (descrito en mayor detalle más adelante). La actividad de un receptor de transmembrana siete puede medirse en un cierto número de maneras, no todas las cuales son adecuadas para cualquier receptor dado. Entre las mediciones de actividades están: alteración en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, activación de fosfolipasa C, alteración de la concentración de inositol trifosfato ( $IP_3$ ) intracelular, alteración en la concentración de diacilglicerol (DAG) intracelular y la alteración en la concentración de de adenosina cíclica 3', 5'-monofosfato (cAMP) intracelular.

25 La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de AdipoR2 puede lograrse, por ejemplo, determinando la capacidad de AdipoR2 para enlazarse o interactuar con una molécula objetivo. La molécula objetivo puede ser una molécula con la cual se enlace o interactúe el AdipoR2 en la naturaleza, por ejemplo, una molécula sobre la superficie de una célula que exprese AdipoR2, una molécula sobre la superficie de una segunda célula, una molécula en el medio extracelular, una molécula asociada con la superficie interna de una membrana celular o una molécula citoplasmática. La molécula objetivo puede ser un componente de una ruta de transducción de señal que facilite la transducción de una señal extracelular (por ejemplo, una señal generada por enlazamiento de un ligando de AdipoR2, a través de la membrana celular y hacia adentro de la célula. La molécula de AdipoR2 objetivo puede ser, una segunda proteína intracelular que tiene actividad catalítica o una proteína que facilita la asociación de las moléculas de asociación corriente abajo con AdipoR2.

35 La determinación de la capacidad de AdipoR2 para enlazarse o interactuar con una molécula objetivo puede lograrse por uno de los métodos descritos más arriba para la determinación del enlazamiento directo. En una realización, la determinación de la capacidad del polipéptido de AdipoR2 para enlazarse a o interactuar con una molécula objetivo puede lograrse determinando la actividad de la molécula objetivo. Por ejemplo, la actividad de la molécula objetivo puede determinarse detectando la inducción de un segundo mensajero celular del objetivo (por ejemplo,  $Ca^{2+}$ , diacilglicerol,  $IP_3$  intracelulares, etc.) detectando la actividad catalítica/enzimática del objetivo sobre un sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen informador (por ejemplo, un elemento regulador que responde a un AdipoR2 enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, luciferasa), o detectando una respuesta celular.

45 También se describen ensayos libres de células. Tales ensayos involucran poner en contacto una forma de AdipoR2 (por ejemplo AdipoR2 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de AdipoR2 o una proteína de fusión que comprende todo o una porción de AdipoR2) con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para enlazarse a AdipoR2. El enlazamiento del compuesto de prueba a AdipoR2 puede determinarse bien sea directa o indirectamente como se describió anteriormente. En una realización, el ensayo incluye poner en contacto AdipoR2 con un compuesto conocido que se enlaza a AdipoR2 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con el compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con AdipoR2, en donde la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con AdipoR2 comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para enlazarse preferencialmente a AdipoR2 en comparación con el compuesto conocido.

50 Los ensayos libres de células son adecuados para uso de una forma enlazada a membrana de AdipoR2 o un fragmento soluble de la misma. En el caso de ensayos libres de células que comprenden la forma enlazada a membrana del polipéptido, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de tal manera que la forma enlazada a membrana del polipéptido se mantenga en solución. Ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen pero no se limitan a detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton X-100, Triton X-114, Thesit, Isotridecipoli(etilen glicol éter)<sub>n</sub>, 3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propano sulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO), o N-dodecil=N,N-dimetil-3-amonio-1-propano sulfonato.

En diversas realizaciones de los métodos de ensayo anteriores, puede ser deseable inmovilizar AdipoR2 (o una molécula objetivo de AdipoR2) para facilitar la separación de las formas complejadas de las que no están complejadas de una o ambas proteínas, así como para acomodar la automatización de la prueba. El enlazamiento de un compuesto de prueba a AdipoR2, o la interacción de AdipoR2 con una molécula objetivo en la presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede lograrse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga. En una realización, puede proveerse una proteína de fusión que se agrega a un dominio que permite que una o ambas proteínas sean enlazadas a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutationa-S-transferasa (GST) o las proteínas de fusión de glutationa-S-transferasa pueden adsorberse sobre perlas de glutationa sefarosa (Sigma Chemical; St. Louis, Mo) o placas de microtitulación derivadas con glutationa, las cuales se combinan con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y bien la proteína objetivo no adsorbida o AdipoR2, y la mezcla se incuba bajo condiciones que llevan a la formación de complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas o los pozos de las placas de microtitulación se lavan para eliminar cualquier compuesto no enlazado y se mide la formación de complejo bien sea directa o indirectamente, por ejemplo, como se describió anteriormente. Alternativamente, los complejos pueden ser disociados de la matriz, y puede determinarse el nivel de enlazamiento o actividad de AdipoR2 utilizando técnicas estándar.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas o matrices también pueden ser utilizadas en los ensayos de selección descritos aquí. Por ejemplo, bien sea AdipoR2 o su molécula objetivo pueden ser inmovilizados utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. AdipoR2 o moléculas objetivo biotinilados puede prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas bien conocidas en el arte (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemical; Rockford, Ill.), e inmovilizados en los pozos de placas recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos reactivos con AdipoR2 o moléculas objetivo pero que no interfieren con el enlazamiento de polipéptido de la invención o su molécula objetivo pueden ser sometidos a la formación de derivados en los pozos de la placa, y puede atraparse el objetivo no enlazado o el polipéptido de la invención en los pozos por conjugación con anticuerpos. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos reactivos con AdipoR2 o molécula objetivo, así como ensayos de enlazamiento con enzima los cuales se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con AdipoR2 o la molécula objetivo.

El ensayo de selección también puede involucrar el monitoreo de la expresión de AdipoR2. Por ejemplo, los reguladores de expresión de AdipoR2 pueden ser identificados en un método en el cual una célula se pone en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión de la proteína o ARNm de AdipoR2 en la célula. El nivel de expresión de la proteína o ARNm de AdipoR2 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión de la proteína o ARNm de AdipoR2 en ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato puede ser identificado entonces como un regulador de la expresión de AdipoR2 con base en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de la proteína o de AdipoR2 o proteína de ARNm es mayor (mayor significativamente desde el punto de vista estadístico) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la expresión de la proteína o ARNm de AdipoR2. Alternativamente, cuando la expresión de la proteína o ARNm de AdipoR2 es menor (menor significativamente desde el punto de vista estadístico) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la expresión de la proteína o ARNm de AdipoR2. El nivel de expresión de la proteína o ARNm de AdipoR2 en las células puede determinarse con métodos descritos más adelante.

#### Ensayos de enlazamiento

Para los ensayos de enlazamiento, el compuesto de prueba es preferiblemente una molécula pequeña que se enlaza a y ocupa el sitio activo de un polipéptido de AdipoR2, siendo por lo tanto que el sitio de enlazamiento de ligandos sea inaccesible a un sustrato de tal forma que se evita una actividad biológica normal. Ejemplo de tales moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, moléculas de péptidos o similares a péptidos pequeños. Ligandos potenciales que se enlazan a polipéptidos de AdipoR2 incluyen, pero no se limitan a, los ligandos naturales de GPCR de AdipoR2 conocidos y análogos o derivados de los mismos.

En ensayos de enlazamiento, bien sea el compuesto de prueba o el polipéptido de AdipoR2 pueden comprender un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente, radioisotópico, quimioluminiscente o enzimático, tal como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o luciferasa. La detección del compuesto de prueba que está enlazado al polipéptido de AdipoR2 puede ser lograda, por ejemplo, mediante el recuento directo de la radioemisión, por recuento de centelleo o por determinación de la conversión de un sustrato apropiado a un producto detectable. Alternativamente, el enlazamiento de un compuesto de prueba a un polipéptido de AdipoR2 puede determinarse sin marcar ninguno de los interactuantes. Por ejemplo, puede utilizarse un microfisiómetro para detectar el enlazamiento de un compuesto de prueba con un polipéptido de AdipoR2. Un microfisiómetro (por ejemplo, Cytosensor™) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la cual una célula acidifica su ambiente utilizando un sensor potenciométrico dirigido por luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación pueden utilizarse como indicador de la interacción entre un compuesto de prueba y el AdipoR2 [Haseloff, 1988].

La determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para enlazarse a la AdipoR2 también puede lograrse utilizando una tecnología tal como el análisis de interacción Biomolecular en Tiempo Real (BIA) [McConnell, (1992) Sjolander, (1991)]. El BIA es una tecnología para estudiar las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore™). Los cambios en la resonancia del plasmón de superficie del fenómeno óptico (SPR) pueden utilizarse como indicación de las reacciones en tiempo real entre las moléculas biológicas.

En otro aspecto, un polipéptido similar al de AdipoR2 puede utilizarse como una “proteína cebo” en un ensayo de dos híbridos o un ensayo de tres híbridos [Szabo, (1995); U.S. 5,283,317], para identificar otras proteínas que se enlazan a o interactúan con AdipoR2 y modular su actividad.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten de dominios separables de enlazamiento a ADN y de activación. En resumen, la prueba utiliza dos constructos de ADN diferentes. Por ejemplo, en un constructo, el polinucleótido que codifica AdipoR2 puede fusionarse con un polinucleótido que codifica el dominio de enlazamiento de ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En el otro constructo una secuencia de ADN que codifica una proteína no identificada (“presa” o “muestra”) puede fusionarse a un polinucleótido que codifica para el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas “cebo” y “presa” son capaces de interactuar in vivo para formar un complejo dependiente de proteína, los dominios de enlazamiento de ADN y activación del factor de transcripción se llevan a cercana proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen informador (por ejemplo, LacZ), el cual está enlazado operativamente a un sitio regulador de la transcripción que responde al factor de transcripción. La expresión del gen informador puede ser detectada, y pueden aislarse las colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional y utilizarse para obtener la secuencia de ADN que codifica la proteína que interactúa con AdipoR2.

Puede ser deseable inmovilizar bien sea el AdipoR2 (o el polinucleótido) o el compuesto de prueba para facilitar la separación del enlace formado de las formas no enlazadas de uno o ambos de los interactuantes, así como para facilitar la automatización de este ensayo. Así, bien sea el polipéptido similar al de AdipoR2 (o polinucleótido) o el compuesto de prueba pueden enlazarse a un soporte sólido. Soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, láminas de vidrio o plástico, placas de cultivo de tejidos, pozos de microtitulación, tubos, chips de silicio, o partículas tales como perlas (incluyendo, pero no limitándose a perlas de látex, poliestireno o vidrio). Cualquier método conocido en la técnica puede ser utilizado para unir el polipéptido similar al de AdipoR2 (o polinucleótido) o compuesto de prueba a un soporte sólido, incluyendo el uso de enlaces covalentes y no covalentes, la absorción pasiva, o pares de unidades estructurales de enlazamiento unidas respectivamente al polipéptido (o polinucleótido) o compuesto de prueba y al soporte sólido. Los compuestos de prueba se enlazan preferiblemente al soporte sólido en una disposición tal que la localización de los compuestos de prueba individuales pueden ser objeto de seguimiento. El enlazamiento de un compuesto de prueba a AdipoR2 (o a un polinucleótido que codifica para AdipoR2) puede lograrse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga.

En una realización, AdipoR2 es una proteína de fusión que comprende un dominio que permite el enlazamiento de AdipoR2 a un soporte sólido. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutatona-S-transferasa pueden adsorberse sobre perlas de glutatona cefarosa (Sigma Chemical, San Luis, Mo) o placas de microtitulación derivadas de glutatona, las cuales se combinan entonces con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y el AdipoR2 no adsorbido; la mezcla se incuba entonces bajo condiciones que llevan a la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las perlas o pozos de placas de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no enlazado. El enlazamiento de los interactuantes puede ser determinado bien sea directa o indirectamente, como se describió anteriormente. Alternativamente, los complejos pueden ser disociados del soporte sólido antes del enlazamiento tal como se determina. Otras técnicas para inmovilizar proteínas o polinucleótidos sobre un soporte sólido también pueden utilizarse en las pruebas de selección descritas aquí. Por ejemplo, bien sea AdipoR2 (o un polinucleótido que codifique para AdipoR2) o un compuesto de prueba puede ser inmovilizado utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. El AdipoR2 biotinilado (o un polinucleótido que codifique AdipoR2 biotinilado) o compuestos de prueba pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación de Pierce Chemical, Rockford, Illinois) e inmovilizados en los pozos de placas recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos que se enlazan específicamente a AdipoR2, polinucleótidos o un compuesto de prueba, pero que no interfieran con un sitio de enlazamiento deseado, tal como el sitio activo de AdipoR2, pueden ser convertidos en derivados en los pozos de la placa. El objetivo o proteína no enlazados pueden quedar atrapados en los pozos por conjugación con anticuerpos.

Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados por GST, incluyen inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos que se enlazan específicamente a un polipéptido de AdipoR2 o al compuesto de prueba, ensayos relacionados con enzimas que se basan en la detección de una actividad del polipéptido de AdipoR2, y electroforesis en gel SDS bajo condiciones no reductoras.

La selección para los compuestos de prueba que se enlazan a polipéptido o polinucleótido de AdipoR2 también pueden llevarse a cabo en una célula intacta. Cualquier célula que comprenda polipéptido o polinucleótido de AdipoR2 puede utilizarse en un sistema de ensayo con base en células. Un polinucleótido de AdipoR2 puede estar presente de forma natural en la célula o puede ser introducido utilizando técnicas tales como las que se describieron anteriormente. El enlazamiento del compuesto de prueba a AdipoR2 o un polinucleótido que codifique AdipoR2 se determina como se describió anteriormente.

#### Ensayos funcionales

Los compuestos pueden ser probados en cuando a la capacidad para incrementar o disminuir la actividad de AdipoR2 de un polipéptido de AdipoR2. La actividad de AdipoR2 puede medirse, por ejemplo, utilizando métodos descritos en los ejemplos específicos, más adelante. La actividad de AdipoR2 puede medirse después de poner en contacto bien sea un AdipoR2 purificado, una preparación de membrana celular, o una célula intacta con un compuesto de prueba. Un compuesto de prueba que haga disminuir la actividad de AdipoR2 en al menos aproximadamente 10, preferiblemente alrededor de 50, más preferiblemente alrededor de 75, 90 o 100% se identifica como un agente potencial para hacer disminuir la actividad de AdipoR2. Un compuesto de prueba que incremente la actividad de AdipoR2 en al menos 10 aproximadamente, preferiblemente alrededor de 50, más preferiblemente alrededor de 75, 90 o 100% se identifica como un agente potencial para incrementar la actividad de AdipoR2.

Un tal procedimiento de selección involucra el uso de melanóforos los cuales son transfectados para expresar AdipoR2. Tal técnica de selección está escrita en PCT WO 92/01810 publicada el 6 de febrero 1992. Así, por ejemplo, tal prueba puede ser empleada para seleccionar un compuesto que inhiba la activación del polipéptido de receptor de AdipoR2 poniendo en contacto las células del melanóforo que codifican el receptor tanto con el ligando receptor como un compuesto que va a ser seleccionado. La inhibición de la señal generada por el ligando indica que un compuesto es un antagonista potencial para el receptor, esto es, inhibe la activación del receptor. La selección puede emplearse para identificar un compuesto que activa el receptor poniendo en contacto tales células con compuestos que se van a seleccionar y determinar si cada compuesto genera una señal, esto es, activa el receptor.

Otras técnicas de selección incluyen el uso de células que expresan AdipoR2 (por ejemplo, células de CHO transfectadas) en un sistema que mide los cambios de pH extracelulares causadas por la activación del receptor [Iwabuchi, (1993)] Por ejemplo, los compuestos pueden ponerse en contacto con una célula que expresa el polipéptido del receptor de AdipoR2 y una segunda respuesta mensajera, esto es, transducción de señal, o cambios de pH, también pueden medirse para determinar si el compuesto potencial activa o inhibe el receptor. Otra técnica de selección tal involucra la introducción de ARN que codifica AdipoR2 en *oocitos de Xenopus* para expresar de forma transiente el receptor. Los oocitos del receptor pueden ponerse en contacto con el ligando del receptor y un compuesto que se vaya a probar, seguido por la detección o inhibición de la activación de la señal de calcio en el caso de la selección de compuestos que se cree inhiben la activación del receptor.

Otras técnicas de selección involucran la expresión de AdipoR2 en células en las cuales el receptor está enlazado a una fosfolipasa C o D. Tales células incluyen células endoteliales, células de músculos lisos, células embrionarias de riñón, etc. La selección puede lograrse tal como se describió anteriormente cuantificando el grado de activación del receptor a partir de cambios en la actividad de fosfolipasa.

#### Expresión del gen

En otra realización, se identifican compuestos de prueba que incrementan o hacen disminuir la expresión del gen de AdipoR2. Tal como se utiliza aquí, el término "se correlaciona con la expresión de un polinucleótido" indica que la detección de la presencia de los ácidos nucleicos, los mismos o relacionados a una secuencia de ácidos nucleicos que codifiquen AdipoR2, por análisis northern o PCR con relación al tiempo es indicativo de la presencia de ácidos nucleicos que codifican AdipoR2 en una muestra, y por lo tanto se correlaciona con la expresión del transcrito desde el polinucleótido que codifica AdipoR2. El término "microdisposición", tal como se utiliza aquí, se refiere a una disposición de distintos polinucleótidos u oligonucleótidos dispuestos sobre un sustrato, tal como papel, nylon u otro tipo de membrana, filtro, chip, lamina de vidrio, o cualquier otro soporte adecuado. Un polinucleótido de AdipoR2 se pone en contacto con un compuesto de prueba y se determina la expresión de un ARN o un producto de polipéptido del polinucleótido de AdipoR2. El nivel de expresión del ARNm o polipéptido apropiados en presencia del compuesto de prueba se compara con el nivel de expresión del ARNm o polipéptido en ausencia del compuesto de prueba. El compuesto de prueba puede ser identificado como un regulador de la expresión con base en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de ARNm o polipéptido es mayor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como un estimulador o potenciador del ARNm o de la expresión de polipéptidos. Alternativamente, la expresión del ARNm o polipéptido es menor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como un inhibidor del ARNm o de expresión del polipéptido.

El nivel de ARNm de AdipoR2 o de la expresión del polipéptido en las células puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica para detectar ARNm o polipéptido. Pueden utilizarse bien sea métodos cualitativos o cuantitativos. La presencia de productos polipeptídicos del polinucleótido de AdipoR2 puede determinarse, por

ejemplo, utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte, incluyendo métodos inmunoquímicos tales como radioinmunoensayo, inmunoprecipitación Western, e inmunohistoquímica. Alternativamente, la síntesis de polipéptidos puede ser determinada in vivo en un cultivo celular, o en un sistema de traducción in vitro detectando la incorporación de aminoácidos marcados en AdipoR2.

- 5 Tal selección puede ser llevada a cabo bien sea en un sistema de ensayo libre de células o en una célula intacta. Cualquier célula que exprese el polinucleótido de AdipoR2 puede ser utilizada como un sistema de prueba con base en células. El polinucleótido de AdipoR2 puede cambiar de forma natural que ocurre en la célula o puede ser introducido utilizando técnicas tales como las descritas anteriormente. Puede usarse bien sea un cultivo primario o una línea celular establecida.

#### 10 Compuestos de prueba

- Compuestos de prueba adecuados para uso en los ensayos de selección pueden obtenerse a partir de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, bibliotecas convencionales de compuestos. Los compuestos de prueba también pueden obtenerse utilizando cualquiera de las numerosas metodologías en métodos de bibliotecas combinacionales conocidas en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o fase en solución paralelas dirigibles espacialmente; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de la biblioteca de "una perla un compuesto"; y métodos de bibliotecas sintéticas utilizando selección por cromatografía de afinidad. La metodología de la biblioteca biológica está limitada a bibliotecas de péptidos, mientras que las otras cuatro metodologías son aplicables a bibliotecas de compuestos peptídicos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas [Lam, (1997)]. Ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica.
- 15 Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución o en perlas, bacterias, esporas, plásmidos o fagos.
- 20

#### Modelación de reguladores

- La modelación por ordenador y las tecnologías de búsqueda permiten la identificación de compuestos o la mejora de compuestos ya identificados, que pueden modular la expresión o actividad de AdipoR2. Habiendo identificado tal compuesto o composición, se identifican los sitios o las regiones activos. Tales sitios activos pueden ser típicamente ser sitios de enlazamiento de ligandos, tales como el dominio de interacción del ligando con AdipoR2. El sitio activo puede ser identificado utilizando métodos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, secuencias de aminoácidos de péptidos, a partir de las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos, o del estudio de complejos del compuesto o composición relevante con su ligando natural. En este último caso, pueden usarse métodos químicos o cristalográficos de rayos X para encontrar el sitio activo hallando dónde sobre el factor se enlaza el ligando complejo.
- 25
- 30

- A continuación, se determina la estructura geométrica tridimensional del sitio activo. Esto puede hacerse mediante métodos conocidos, incluyendo cristalografía de rayos X, la cual puede determinar una estructura molecular completa. Por otro lado, pueden utilizarse RMN de fase sólida o líquida para determinar ciertas distancias intramoleculares. Cualquier otro método experimental de la determinación de la estructura puede utilizarse para obtener estructuras geométricas parciales o completas. Las estructuras geométricas pueden ser medidas con un ligando complejo, natural o artificial, que puede incrementar la exactitud de la estructura del sitio activo determinado.
- 35

- Si se determina una estructura incompleta o insuficientemente exacta, los métodos de modelación numérica basados en ordenador pueden utilizarse para completar la estructura o mejorar su exactitud. Puede utilizarse cualquier método de modelación reconocido, incluyendo modelos parametrizados específicos para biopolímeros en particular tales como proteínas o ácidos nucleicos, modelos moleculares dinámicos basados en el cálculo de movimientos moleculares, modelos mecánicos estadísticos basados en conjuntos térmicos, o modelos combinados. Para la mayor parte de los modelos, los campos de fuerza moleculares estándar, que representan las fuerzas entre los átomos y los grupos constituyentes, son necesarios, y pueden seleccionarse a partir de campos de fuerza conocidos en la química física. Las estructuras experimentales incompletas o menos exactas pueden servir como restricciones a las estructuras más completas y más exactas calculadas por estos métodos de modelización.
- 40
- 45

- Finalmente, habiendo determinado la estructura del sitio activo, bien sea experimentalmente, por modelación o por una combinación, los compuestos de modulación candidatos pueden ser identificados buscando en bases de datos que contengan compuestos junto con la información de su estructura molecular. Tal búsqueda busca compuestos que tengan estructuras que coincidan con la estructura del sitio activo determinado y que interactúen con los grupos que definen el sitio activo. Tal búsqueda puede ser manual, pero preferiblemente asistida por ordenador. Estos compuestos encontrados en este sitio son compuestos moduladores de AdipoR2 potenciales.
- 50

- Alternativamente, estos métodos pueden ser utilizados para identificar compuestos de modulación mejorados a partir de un compuesto o ligando de modulación ya conocido. La composición del compuesto conocido puede ser modificada y los efectos estructurales de las modificaciones pueden determinarse utilizando los métodos de modelación de ordenación experimentales y de ordenador descritos anteriormente aplicados a la nueva composición. La estructura alterada es comparada entonces con la estructura del sitio activo del compuesto para determinar si se presenta el resultado de un encaje mejorado o interacción. De esta manera, las variaciones sistemáticas en la composición, tales como las resultantes de variar los grupos laterales, puede evaluarse
- 55

rápidamente para obtener compuestos o ligandos de modificados de modulación modificada de especificidad o actividad mejorada.

Indicaciones y métodos terapéuticos

Se encontró por parte del presente solicitante que la AdipoR2 se expresa en diversos tejidos humanos.

5 Neurología

Los trastornos de CNS incluyen trastornos del sistema nervioso central, así como trastornos del sistema nervioso periférico.

10 Los trastornos del CNS incluyen, pero no se limitan a lesiones cerebrales, enfermedades cerebrovasculares y sus consecuencias, enfermedad de Parkinson, degeneración corticobasal, enfermedad neuronal motora, demencia, incluyendo ALS, esclerosis múltiple, lesión traumática del cerebro, apoplejía, postapoplejía, lesión cerebral postraumática, y enfermedad cerebrovascular de vasos pequeños. Las demencias, tales como la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal y parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17, demencias frontotemporales, incluyendo enfermedad de Pick, parálisis nuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Huntington, degeneración del tálamo, demencia de Creutzfeld-Jakob, demencia por VIH, esquizofrenia con demencia y psicosis de Korsakoffs, con el significado de la definición también se consideran como trastornos del CNS.

15 De la misma forma, también se considera como desórdenes del CNS desórdenes relacionados con la cognición, tales como incapacidad cognitiva media, incapacidad de memoria asociada con la edad, declinación cognitiva relacionada con la edad, incapacidad cognitiva vascular, trastornos de déficit de atención, trastornos de hiperactividad con déficit de atención, y perturbaciones en la memoria en niños con discapacidades de aprendizaje.

20 El dolor, junto con el significado de esta definición, también se considera como un trastorno del CNS. El dolor puede estar asociado con trastornos de CNS, tales como esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, ciática, síndrome de cirugía de espalda fallido, lesión traumática del cerebro, epilepsia, enfermedad de Parkinson, postapoplejía y lesiones vasculares en el cerebro y en la médula espinal (por ejemplo, infarto, hemorragia, malformación vascular).

25 Dolor neuropático no central incluye el asociado con dolor postmastectomía, sensación fantasma, distrofia simpática refleja (RSD), neuralgiarradioculopatía trigeminal, dolor postquirúrgico, dolor relacionado con VIH/SIDA, dolor por cáncer, neuropatías metabólicas (por ejemplo, neuropatía diabética, neuropatía vasculítica secundaria para enfermedades de tejidos conectivos), polineuropatía paraneoplástica asociada, por ejemplo, con carcinoma de pulmones, o leucemia, o linfoma, o carcinoma de próstata, colon o estómago, neuralgia trigeminal, neuralgias craneanas y neuralgia post-herpética. Dolor asociado con daños en los nervios periféricos, dolor central (esto es debido a isquemia cerebral) y diversos dolores crónicos, por ejemplo, lumbago, dolor de espalda (dolor de la parte baja de la espalda), dolor inflamatorio y/o reumático. Dolor de cabeza (por ejemplo, migraña con aura, migraña sin aura, y otros trastornos de migrañas), dolor de cabeza tipo tensión episódico y crónico, dolor de cabeza tipo tensión, dolor de cabeza en racimos, y hemicránea paroxismal crónica son también trastornos del CNS.

30 Dolor visceral tal como pancreatitis, cistitis intestinal, dismenorrea, síndrome de intestinos irritables, enfermedad de Crohn, cólico biliar, cólico uretral, infarto del miocardio y síndromes de dolor de la cavidad pélvica, por ejemplo, vulvodinia, orquialgia, síndrome uretral y protodinia son también trastornos del CNS

También se considera un trastorno del sistema nervioso dolores agudos, por ejemplo, dolores postoperatorios y dolores después de un trauma.

40 La AdipoR2 humano se expresa altamente en los siguientes tejidos cerebrales: cerebro, lóbulo parietal, nucleus accumbens, putamen, tálamo posteroventral, tálamo dorsomedial, médula espinal (cuerno ventral), retina.

Trastornos cardiovasculares

45 Fallo cardíaco se define como un estado patofisiológico en el cual una anomalía de la función cardíaca es responsable por el fallo del corazón para bombear sangre a una tasa conmesurada con el requerimiento de los tejidos metabolizantes. Incluye todas las formas de fallos de bombeo tales como salida alta y salida baja, agudo y crónico, del lado derecho o del lado izquierdo, sistólico o diastólico, independientemente de la causa subyacente.

50 El infarto del miocardio (MI) es causado generalmente por un descenso abrupto en el flujo de sangre coronaria que sigue a una oclusión trombótica de una arteria coronaria previamente estrechada por arterioesclerosis. La profilaxis del MI (prevención primaria y secundaria) está incluida así como el tratamiento agudo de MI y la prevención de complicaciones.

Las enfermedades isquémicas son condiciones en las cuales el flujo coronario se restringe resultando en una perfusión la cual es inadecuada para satisfacer el requerimiento del miocardio por oxígeno. Este grupo de enfermedades incluye angina estable, angina inestable e isquemia asintomática.

Las arritmias incluyen todas las formas de taquiarritmias atriales y ventriculares, taquicardia atrial, agitación atrial, fibrilación atrial, taquicardia de reentrada atrioventricular, síndrome de preexcitación, taquicardia ventricular, agitación ventricular, fibrilación ventricular, así como formas bradicárdicas o de arritmias.

- 5 Enfermedades vasculares hipertensivas incluyen hipertensión arterial primaria así como todas las clases de secundaria, renal, endocrina, neurogénica y otras. Los genes pueden ser utilizados como objetivos de los fármacos para el tratamiento de la hipertensión así como para la prevención de todas las complicaciones que surgen de las enfermedades cardiovasculares.

- 10 Las enfermedades vasculares periféricas se definen como enfermedades vasculares en las cuales el flujo arterial y/o venoso se reduce dando como resultado un desbalance entre el suministro de sangre y la demanda de oxígeno de los tejidos. Incluye enfermedad oclusiva arterial periférica crónica (PAOD), trombosis arterial aguda y embolismo, trastornos vasculares inflamatorios, fenómeno de Raynaud y trastornos venosos.

- 15 La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular en la cual las paredes de los vasos se remodelan, comprometiendo el lumen del vaso. El proceso de remodelación aterosclerótica involucra la acumulación de células, tanto células musculares lisas como células inflamatorias monocito/macrófago, en la íntima de la pared celular. Estas células consumen lípidos, probablemente de la circulación, para formar una lesión aterosclerótica madura. Aunque la formación de estas lesiones es un proceso crónico, que ocurre durante décadas de un adulto humano, la mayor parte de la morbilidad asociada con la aterosclerosis ocurre cuando una lesión se rompe, liberando residuos trombogénicos que rápidamente ocluyen la arteria. Cuando tal evento agudo ocurre en la arteria coronaria, puede seguir un infarto del miocardio, y en el peor de los casos, puede dar como resultado la muerte.

- 20 Puede considerarse que la formación de la lesión aterosclerótica ocurre en cinco etapas superpuestas tales como migración, acumulación de lípidos, reclutamiento de células inflamatorias, proliferación de células musculares lisas vasculares, y deposición de matriz extracelular. Se demuestra que cada uno de estos procesos ocurre en modelos humanos y en modelos animales de aterosclerosis, pero la contribución relativa de cada uno a la patología y al significado clínico de la lesión no está clara.

- 25 Así, existe una necesidad para métodos terapéuticos y agentes para tratar patologías cardiovasculares, tales como aterosclerosis y otras condiciones relacionadas con enfermedades arteriales coronarias.

- 30 Las enfermedades cardiovasculares incluyen, pero no se limitan a trastornos del corazón y al sistema vascular tales como fallo cardíaco congestivo, infarto del miocardio, enfermedades isquémicas del corazón, todas las clases de arritmias atriales y ventriculares, enfermedades vasculares hipertensivas, enfermedades vasculares periféricas, y aterosclerosis.

- 35 Niveles muy altos o muy bajos de grasas en la corriente sanguínea, especialmente de colesterol, pueden producir problemas a largo plazo. El riesgo de desarrollar aterosclerosis y enfermedades de las arterias coronarias o arterias carótidas (y así el riesgo de tener un ataque cardíaco o apoplejía) se incrementa con un incremento en el nivel total de colesterol. No obstante, niveles de colesterol extremadamente bajos pueden no ser saludables. Ejemplos de trastornos de metabolismo de los lípidos son hiperlipidemia (niveles anormalmente altos de grasas (colesterol, triglicéridos o ambos) en la sangre, y pueden ser causados por historia familiar de hiperlipidemia), obesidad, una dieta alta en grasas, falta de ejercicio, consumo de moderado a alto de alcohol, el consumo de cigarrillos, diabetes pobremente controlada y una glándula tiroides poco activa), hiperlipidemias hereditarias (hiperlipoproteinemia tipo I (hiperquilomicronemia familiar), hiperlipoproteinemia tipo II (hipercolesterolemia familiar), hiperlipoproteinemia tipo III, hiperlipoproteinemia tipo IV, o hiperlipoproteinemia tipo V), hipolipoproteinemia, lipidosis (causada por anomalías en las enzimas que metabolizan las grasas), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Fabry, enfermedad de Wolman, xantomatosis cerebrotendinosa, sitosterolemia, enfermedad de Refsum, o enfermedad de Tay-Sachs.

- 45 Los trastornos en los riñones también pueden llevar a hipertensión o hipotensión. Ejemplos de problemas renales que posiblemente, lleven a hipertensión son la estenosis arterial renal, pielonefritis, glomerulonefritis, tumores renales, enfermedad renal poliquística, lesiones en el riñón o terapia de radiación que afecte el riñón. Una urinación excesiva puede llevar a hipotensión.

- 50 La AdipoR2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos cardiovasculares relacionados: corazón, pericardio, atrio del corazón (izquierdo), ventrículo del corazón (izquierdo), ventrículo del corazón (derecho), aorta, arteria coronaria, arteria mesentérica, vena (saphena magna), vena (cava), células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales aórticas, glándula adrenal, adiposos. La expresión en los tejidos antes mencionados demuestra que la AdipoR2 o el ARNm humana pueden ser utilizados para diagnosticar enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente la actividad de la AdipoR2 humana puede ser modulada para tratar las enfermedades cardiovasculares.

- 55 La AdipoR2 humana se expresa altamente en tejidos adiposos. La expresión en tejidos adiposos demuestra que la AdipoR2 o el ARNm humano pueden ser utilizados para diagnosticar enfermedades basadas en dislipidemia como

un trastorno cardiovascular. Adicionalmente la actividad de la AdipoR2 humana puede ser modulada para tratar - pero no limitándose a - enfermedades de la dislipidemia.

La AdipoR2 humano se expresa altamente en la glándula adrenal.

#### Trastornos hematológicos

- 5 Los trastornos hematológicos comprenden enfermedades de la sangre y todos sus constituyentes así como enfermedades de los órganos y tejidos involucrados en la generación o degradación de todos los constituyentes de la sangre. Incluyen pero no se limitan a: 1) Anemias, 2) Trastornos mieloproliferativos, 3) Trastornos hemorrágicos, 4) Leucopenia, 5) Trastornos eosinofílicos, 6) Leucemias, 7) Linfomas, 8) Discrasias de células del plasma, 9) Trastornos del bazo en el curso de trastornos hematológicos. Los trastornos de acuerdo con 1) incluyen, pero no se limitan a anemias debidas a hemosíntesis defectuosa o deficiente, en eritropoyesis deficiente. Trastornos de acuerdo con 2) incluyen, pero no se limitan a policitemia vera, eritrocitosis asociada con tumores, mielofibrosis, trombocitemia. Trastornos de acuerdo con 3) incluyen, pero no se limitan a vasculitis, trombocitopenia, trombocitopenia inducida por heparina, trombocitopenia púrpura trombótica, síndrome hemolítico-urémico, trastornos hereditarios y adquiridos de la función de las plaquetas, trastornos hereditarios de la coagulación. Trastornos de acuerdo con 4) incluyen, pero no se limitan a neutropenia, linfocitopenia. Trastornos de acuerdo con 5) incluyen, pero no se limitan a hiperosinofilia, síndrome hiperosinofílico idiopático. Trastornos de acuerdo con 6) incluyen, pero no se limitan a leucemia mielótica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica, síndrome mielodisplástico. Trastornos de acuerdo con 7) incluyen, pero no se limitan a enfermedad de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma de células T cutáneas por micosis fungoides. Trastornos de acuerdo con 8) incluyen, pero no se limitan a mieloma múltiple, macroglobulinemia, enfermedades de cadenas pesadas. En extensión de lo precedente, se pueden considerar también como enfermedades hematológicas la púrpura trombocitopénica idiopática, anemia por deficiencia de hierro, anemia megaloblástica (deficiencia de vitamina B12), anemia aplásica, talasemia, invasión de la médula ósea por linfoma maligno, invasión de la piel por linfoma maligno, síndrome urémico hemolítico, enfermedad de plaquetas gigantes.
- 25 La AdipoR2 humano se expresa altamente en los siguientes tejidos del sistema hematológico: eritrocitos, células CD34+ cordales de la sangre, neutrófilos cordales de la sangre, células T CD8+ de la sangre periférica, células B CD19+ de la sangre periférica, neutrófilos de la sangre periférica.

#### Enfermedades gastrointestinales y del hígado

- 30 Las enfermedades gastrointestinales comprenden enfermedades primarias o secundarias, agudas o crónicas de los órganos del tracto gastrointestinal que pueden ser adquiridas o heredadas, benignas o malignas o metaplásticas, y que pueden afectar los órganos del tracto gastrointestinal o el cuerpo como un todo. Comprenden pero no se limitan a 1) trastornos del esófago tales como acalasia, acalasia vigorosa, disfagia, incoordinación cricofaríngea, disfagia pre-esofágica, espasmo esofágico difuso, sensación de globus, metaplasia de Barrett, reflujo gastroesofágico, 2) trastornos del estómago y duodeno tales como dispepsia funcional, inflamación de la mucosa gástrica, gastritis, gastritis por estrés, gastritis erosiva crónica, atrofia de las glándulas gástricas, metaplasia de los tejidos gástricos, úlceras gástricas, úlceras duodenales, neoplasmas del estómago, 3) trastornos del páncreas tales como pancreatitis aguda o crónica, insuficiencia de los tejidos exocrínicos o endocrínicos del páncreas tales como esteatorrea, diabetes, neoplasmas del páncreas exocrino o endocrino como 3.1) síndrome de neoplasia endocrina, adenocarcinoma ductal, cistadenocarcinoma, tumores de las células de las isletas, insulinooma, gastrinoma, tumores carcinoides, glucagonoma, síndrome de Zollinger-Ellison, síndrome de Vipoma, síndrome de mala absorción, 4) trastornos del intestino tales como enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, enfermedad de Crohn, íleo, diarrea y constipación, inercia colónica, megacolon, síndrome de mala absorción, colitis ulcerativa, 4.1) trastornos funcionales del intestino tales como síndrome de intestino irritable, 4.2) neoplasmas del intestino tales como poliposis familiar, adenocarcinoma, linfoma maligno primario, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, pólipos, 45 cáncer del colon y recto.

- Enfermedades del hígado comprenden enfermedades primarias o secundarias, agudas o crónicas o lesiones en el hígado que pueden ser adquiridas o heredadas, benignas o malignas, y que pueden afectar el hígado o el cuerpo como un todo. Comprenden pero no se limitan a los trastornos del metabolismo de la bilirrubina, ictericia, síndromes de Gilbert, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson y Rotor; colestasis intrahepática, hepatomegalia, hipertensión portal, ascites, síndrome de Budd-Chiari, encefalopatía portal-sistémica, hígado graso, esteatosis, síndrome de Reye, enfermedades del hígado debidas al alcohol, hepatitis o cirrosis alcohólica, fibrosis y cirrosis, fibrosis y cirrosis del hígado debida a errores innatos del metabolismo o sustancias exógenas, enfermedades de almacenamiento, síndromes de Gaucher, Zellweger, Wilson - enfermedad, aguda o crónica de hepatitis, hepatitis viral y sus variantes, condiciones inflamatorias del hígado debido a virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos; trastornos del hígado inducidos por fármacos, enfermedades crónicas del hígado como colangitis esclerosante primaria, deficiencia de alfa<sub>1</sub>-antitripsina, cirrosis biliar primaria, trastornos postoperatorios del hígado tales como colestasis intrahepática postoperatoria, granulomas hepáticos, enfermedades vasculares del hígado asociadas con enfermedades sistémicas, neoplasmas benignos o malignos del hígado, perturbación del metabolismo del hígado en recién nacidos o nacidos prematuramente.

La AdipoR2 humano se expresa altamente en los siguientes tejidos del sistema gastroenterológico: estómago, tumor de estómago, intestino delgado, recto, tumor del recto.

#### Enfermedades dermatológicas

- 5 La piel cumple varias funciones. Es un sistema de órganos en capas múltiples que construye una cubierta protectora efectiva y regula la temperatura del cuerpo, siente el dolor y los estímulos placenteros, evita que las sustancias entren al cuerpo, y proporciona un escudo para los efectos nocivos del sol. El color, textura y pliegues de la piel ayuda a marcar a las personas como individuos. Así, los trastornos o enfermedades de la piel tienen frecuentemente consecuencias importantes para la salud física y mental. Los trastornos de la piel incluyen, pero no se limitan a las condiciones descritas en lo que sigue.
- 10 Picazón (prurito) es una sensación que instintivamente demanda rascar, la cual puede ser causada por una condición de la piel o una enfermedad sistémica.
- 15 Los trastornos superficiales de la piel afectan la capa superior de la piel, el stratum corneum o la capa de queratina y consiste de muchas capas de células muertas aplanadas y actúa como una barrera para proteger el tejido subyacente de lesiones e infección. Los trastornos de las capas superficiales de la piel involucran el stratum corneum y capas más profundas de la epidermis.
- Ejemplos de trastornos superficiales de la piel se proveen en lo que sigue.
- 20 La piel seca frecuentemente se presenta en personas que pasan la edad mediana, la piel severamente seca (ictiosis) es el resultado de una enfermedad progresiva heredada, tal como ictiosis vulgaris o hiperqueratosis epidermolítica. La ictiosis también es el resultado de trastornos no hereditarios, tales como lepra, tiroides con baja actividad, linfoma, SIDA, y sarcoidosis.
- La queratosis pilaris es un trastorno común en el cual las células muertas se desprenden de la capa superior de la piel y forman aglomeraciones que llenan las aberturas de los folículos capilares.
- Un callo es un área del stratum corneum o de la capa de queratina que se hace anormalmente gruesa en respuesta a un frotamiento repetido.
- 25 Una dureza es un área del tamaño de un guisante, engrosada de queratina que se presenta en los pies.
- La soriasis es una enfermedad crónica recurrente reconocible por ampollas progresivas plateadas y placas de diversos tamaños (parches elevados). Una tasa anormalmente alta de crecimiento y conversión de las células de la piel produce la progresión.
- 30 La pitiriasis rosea es una enfermedad moderada que produce una piel inflamada, creciente coloreada de rosa. La pitiriasis rosea es causada posiblemente por un agente infeccioso, aunque no se ha identificado ninguno.
- El liquen planus, una enfermedad con picor recurrente, inicia como una irritación de pequeñas ampollas discretas que luego se combinan y se convierten en placas duras progresivas (parches crecientes).
- La dermatitis (eczema) es una inflamación de las capas superiores de la piel, que produce ampollas, rojez, hinchamiento, formación de viscosidad, formación de costras, formación de escamas, y usualmente con picor.
- 35 Las formas de dermatitis son dermatitis por contacto, o dermatitis crónica de las manos y pies, por ejemplo, Ponfolix.
- Ejemplos adicionales de trastornos dermatíticos son dermatitis atópica, dermatitis seborreica, dermatitis nummular, dermatitis exfoliativa generalizada, dermatitis stasis, o dermatitis por raspado localizado (lichen simplex chronicus, neurodermatitis).
- 40 Otros trastornos de la piel son causados por inflamación. La piel puede abrirse en una variedad de raspaduras, irritaciones y ampollas. Algunas erupciones de la piel pueden incluso amenazar la vida.
- Las irritaciones por fármacos son efectos laterales de las medicaciones, principalmente reacciones alérgicas a las medicaciones. La necrólisis epidérmica tóxica es una enfermedad de la piel que amenaza la vida en la cual la capa superior de la piel se desprende en láminas. Esta condición puede ser causada por la reacción a un fármaco, o por alguna otra enfermedad seria.
- 45 El eritema multiforme, causado frecuentemente por herpes simplex es un trastorno caracterizado por parches de piel roja levantada que frecuentemente se parece a dianas y usualmente están distribuidas simétricamente en todo el cuerpo.
- El eritema nodosum es una enfermedad inflamatoria que produce ampollas rojas suaves (nódulos) bajo la piel, lo más frecuentemente sobre las espinillas pero ocasionalmente sobre los brazos y otras áreas.

El granuloma anular es una condición crónica de la piel de causa desconocida en las cuales ampollas pequeñas, firmes, elevadas forman un anillo con una piel normal o ligeramente hundida en el centro.

Algunos trastornos de la piel son caracterizados como enfermedades de ampollamiento. Tres enfermedades autoinmunes - pémfigus, bulus pemfigoide y dermatitis herpetiformis – están entre las más serias.

- 5 El pémfigus es una enfermedad poco común, algunas veces fatal, en la cual rompen ampollas (bulla) de tamaños variados en la piel, el recubrimiento de la boca y otras membranas mucosas.

El bullous pemfigoide es una enfermedad autoinmune que produce el ampollamiento.

- 10 La dermatitis herpetiformis es una enfermedad autoinmune en la cual aglomeraciones de ampollas pequeñas con intenso picor y en forma de colmena aparecen y persisten. En personas con la enfermedad, las proteínas del trigo, centeno, cebada y productos de avena activan el sistema inmune, el cual ataca parte de la piel árida causando algunas veces la irritación y picazón.

Los trastornos en el sudor también pertenecen a los trastornos de la piel.

El salpullido es una irritación con picor de la piel causada por sudor atrapado.

- 15 La sudoración excesiva (hiperhidrosis) puede afectar la superficie completa de la piel, pero frecuentemente se limita a las palmas, plantas, axilas, o ingle. El área afectada frecuentemente se torna rosa o blanco azulado, y en casos severos la piel puede rajarse, hacerse escamosa y blanda, especialmente en los pies.

Los trastornos de la piel pueden afectar las glándulas sebáceas. Las glándulas sebáceas, que secretan aceites sobre la piel, yacen en la dermis, la capa de piel justo por debajo de la capa superficial (epidermis). Los trastornos de las glándulas sebáceas incluyen acné, rosácea, dermatitis perioral y quistes sebáceos.

- 20 El acné es una condición común de la piel en la cual los poros de la piel se atascan, llevando a espinillas e inflamaciones, abscesos infectados (acumulación de pus). El acné tiende a desarrollarse en adolescentes.

El acné se subdivide adicionalmente en acné superficial o acné profundo.

La rosácea es un trastorno persistente de la piel que produce rojez, espinillas delgadas y vasos sanguíneos rotos, usualmente en el área central del rostro.

- 25 La dermatitis perioral es una irritación roja, frecuentemente con inflamación alrededor de la boca y de la mejilla.

Un quiste sebáceo (quiste queratinoso) es una formación de crecimiento lento que contiene piel muerta, excreciones de la piel y otras partículas de piel. Estos quistes pueden ser pequeños y pueden aparecer en cualquier lugar.

Los trastornos del cabello también son trastornos de la piel. Los trastornos del cabello incluyen pilosidad excesiva, calvicie y vellos de barba de crecimiento hacia dentro

- 30 La piel puede ser infectada por bacterias. Las infecciones bacterianas de la piel pueden variar en cuanto a su gravedad desde un acné menor hasta una condición amenazadora para la vida, tal como síndrome de la piel escaldada por Estafilococcus. Las infecciones de piel bacterianas más comunes son causadas por Estafilococcus y Estreptococcus. Los factores de riesgo para las infecciones de la piel son por ejemplo diabetes, SIDA o lesiones de la piel.

- 35 El impétigo es una infección de la piel, causada por Estafilococcus o Estreptococcus, que lleva a la formación de pequeñas ampollas llenas de pus (pústulas).

La foliculitis es una inflamación de los folículos capilares causada por la infección con Estafilococcus. La infección daña los cabellos, los cuales pueden ser arrancados fácilmente. Los furúnculos son áreas grandes, suaves, hinchadas, elevadas causadas por infección con Estafilococcus alrededor de los folículos capilares.

- 40 Los carbunclos son acumulaciones de furúnculos que dan como resultado una inflamación extensa de la piel y la formación de cicatrices. Los carbunclos se desarrollan y se curan más lentamente que los furúnculos sencillos y pueden llevar a fiebre y fatiga.

- 45 La erisipela es una infección de la piel causada por Estreptococcus. Se desarrolla una irritación brillante, roja, ligeramente hinchada suave, frecuentemente con ampollas pequeñas. Los nódulos linfáticos alrededor del área infectada pueden agrandarse y hacerse dolorosos.

La celulitis es una infección que se esparce, y en algunas veces por debajo, de las capas más profundas de la piel. La celulitis más frecuentemente es el resultado de una infección por Estreptococcus o una infección por Estafilococcus. Sin embargo, muchas otras bacterias también pueden causar celulitis.

La paroniquia es una infección alrededor del borde de la uña de manos o pies. La paroniquia puede ser causada por muchas diferentes bacterias, incluyendo seudomonas y Proteus, y por hongos, tales como Cándida.

- 5 El síndrome de piel escaldada por Estafilococcus es una infección de la piel ampliamente esparcida que puede llevar a un síndrome de choque tóxico, en el cual la piel se desprende como si estuviese quemada. Ciertos tipos de Estafilococcus producen una sustancia tóxica que hace que la capa superior de la piel (epidermis) se separe del resto de la piel.

La eritrasma es una infección de las capas superiores de la piel causada por la bacteria *Corynebacterium minutissimum*.

- 10 Las infecciones de la piel son causadas frecuentemente por hongos. Los hongos que infectan la piel (dermatofitos) viven solamente sobre la capa muerta, más superior (stratum corneum) y no penetran más profundamente. Algunas infecciones fúngicas no producen síntomas o producen solamente una pequeña cantidad de irritación, formación de escamas y rojez. Otras infecciones fúngicas producen picor, hinchamiento, ampollas y formación de escamas severa.

- 15 Tiña es una infección fúngica de la piel producida por diferentes hongos y clasificada generalmente por su localización en el cuerpo.

Ejemplos son el pie de atleta (tiña del pie, producido bien sea por Tricofiton o Epidermofiton), picazón del escroto (tiña de la ingle, que puede ser causado por una variedad de hongos y levaduras), tiña del cráneo, causado por Tricofiton o Microsporum), tiña de las uñas y tiña del cuerpo (producido por Tricofiton).

- 20 La candidiasis (infección con levadura, moniliasis) es una infección producida por la levadura Cándida. La Cándida usualmente infecta la piel y las membranas mucosas, tales como el recubrimiento de la boca y la vagina. Raramente, invade tejidos más profundos así como sangre, produciendo candidiasis sistémica que es amenazadora para la vida. Pueden distinguirse los siguientes tipos de infecciones por cándida: Infecciones en los pliegues de la piel (infecciones intertriginosas), infecciones por Candida vaginales y del pene (vulvovaginitis), afta, Perlèche (infección por cándida en las comisuras de la boca), paroniquia por cándida (crecimiento de Cándida en la madre de las uñas, produciendo hinchamiento doloroso y pus).

Tinea versicolor es una infección fúngica que produce parches blancos a marrón pálido sobre la piel.

La piel también puede ser afectada por parásitos, principalmente insectos, o gusanos pequeños.

La roña es una infestación por garrapatas que produce ampollas rojizas pequeñas y severa picazón. La roña es causado por la garrapata *Sarcoptes scabiei*.

- 30 La infestación con piojos (pediculosis) produce intensa picazón y puede afectar casi cualquier área de la piel. Los piojos de la cabeza y los piojos púbicos son dos especies diferentes.

La erupción viscosa (larva migrans cutánea) es una infección por un gusano transmitida a través de suelo caliente y húmedo a la piel expuesta. La infección es causada por un gusano de gancho que normalmente habita en perros y gatos.

- 35 Muchos tipos de virus invaden la piel. Los importantes medicamento producen verrugas e irritaciones frías (ampollas de fiebre) en los labios. Las verrugas son causadas por el virus del papiloma, y las irritaciones frías son causadas por el virus herpes simplex. Otro grupo importante de virus que afectan la piel pertenece a la familia de virus de viruela. La varicela sigue siendo una infección infantil común. Un virus de viruela también produce molluscum contagiosum, el cual es una infección de la piel causada por un virus de viruela que produce ampollas de color piel, suaves, cerosas.

La luz del sol puede producir severos daños en la piel. Las quemaduras solares provienen de una sobreexposición a los rayos ultravioleta B (UVB). Algunas personas quemadas por el sol desarrollan fiebre, escalofríos y debilidad, y aquellas con quemaduras solares muy fuertes pueden incluso entrar en shock por presión sanguínea baja y desmayo.

- 45 Las personas que permanecen mucho tiempo en el sol tienen un riesgo incrementado de cánceres de piel, incluyendo carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, y en algún grado, melanoma maligno.

Los fármacos, entre otras causas, pueden producir reacciones de fotosensibilidad las cuales pueden ocurrir después de sólo unos minutos de exposición al sol. Estas reacciones incluyen rojez, desprendimiento, urticaria, y ampollas escamosas engrosadas (fotosensibilidad).

- 50 Algunos trastornos de la piel son trastornos caracterizados por trastornos de pigmentación.

El albinismo es un trastorno raro heredado en la cual no se forma melanina.

El vitiligo es una condición en la cual una pérdida de melanocitos da como resultado parches suaves blancuzcos de piel, los cuales pueden presentarse después de un trauma físico inusual y tienden a ocurrir con ciertas otras enfermedades, incluyendo la enfermedad de Addison, diabetes, anemia perniciosa y enfermedad de la tiroides.

La Tinea versicolor es una infección fúngica de la piel que a veces da como resultado una hiperpigmentación.

- 5 Los melasmas aparecen en el rostro (usualmente en la frente, mejillas, sienes y mandíbulas) como un grupo difícilmente simétrico de parches marrón oscuro de pigmentación que están claramente delineados.

Los crecimientos en la piel, que son acumulaciones anormales de diferentes tipos de células, pueden estar presentes en el nacimiento o desarrollarse más adelante. Se distinguen tipos de crecimientos no cancerosos (benignos) y cancerosos (malignos).

- 10 Los lunares (nevi) son crecimientos pequeños, usualmente oscuros de piel que se desarrollan a partir de células productoras de pigmento en la piel (melanocitos). La mayoría de los lunares son inofensivos. Sin embargo, los lunares no cancerosos pueden convertirse en melanomas maligno.

Las placas de la piel son aletas de piel suaves, pequeñas, color carne o ligeramente más oscuras que aparecen principalmente en el cuello, en las axilas o la ingle.

- 15 Los lipomas son depósitos suaves de material graso que crecen bajo la piel, produciendo hinchazones redondas u ovaladas.

Los angiomas son acumulaciones de vasos sanguíneos o linfáticos densos que se localizan usualmente en y por debajo de la piel y que pueden producir decoloraciones rojas o púrpura. Ejemplos de angiomas son manchas oporto, marcas color fresa, hemangiomas cavernosos, emangiomas de araña y linfangiomas.

- 20 Los granulomas piogénicos son áreas elevadas escarlata, marrón o negro azulosas ligeramente levantadas, causadas por el crecimiento incrementado de capilares (los vasos sanguíneos más pequeños) e hinchamiento del tejido circundante.

Las queratosis seborreica (algunas veces llamada verrugas seborreicas) son crecimientos color carne, marrón o negros que pueden aparecer en cualquier parte de la piel.

- 25 Los dermatofibromas son hinchazones pequeñas, de rojo a marrón (nódulos) que son el resultado de la acumulación de fibroblastos, las células que pueblan el tejido suave bajo la piel. Los queratoacantomas son crecimientos redondos, firmes, usualmente color carne, que tienen un cráter central inusual que contiene un material pastoso.

Los queloides son crecimientos suaves, brillantes, ligeramente rosas, frecuentemente en forma de domo, proliferativos de tejido fibroso que se forma sobre áreas de lesión o sobre heridas quirúrgicas.

- 30 El cáncer de piel es la forma más común de cáncer, pero la mayor de los tipos de cáncer de piel son curables.

El carcinoma de las células basales es un cáncer que se origina en la capa inferior de la epidermis.

El carcinoma de cáncer escamoso es un cáncer que se origina en la capa media de la epidermis.

La enfermedad de Bowen es una forma de células escamosas que está confinado a la epidermis y que no ha invadido aún la dermis subyacente.

- 35 El melanoma es un cáncer que se origina en las células productoras de pigmentos de la piel (melanocitos).

El sarcoma de Kaposi es un cáncer que se origina en los vasos sanguíneos, usualmente de la piel. La enfermedad de Paget es un tipo raro de cáncer de piel que parece un parche inflamado, enrojecido de piel (dermatitis); se origina en glándulas en o bajo la piel.

El AdipoR2 humano se expresa altamente en los siguientes tejidos dermatológicos: piel

- 40 Desórdenes de cáncer

Los desórdenes de cáncer dentro del alcance de esta definición comprenden cualquier enfermedad de un órgano o tejido en mamíferos caracterizada por una multiplicación pobremente controlada o no controlada de células normales o anormales en ese tejido y su efecto en el cuerpo como un todo. Las enfermedades de cáncer dentro del alcance de la definición comprenden neoplasmas benignos, displasias, hiperplasias, así como neoplasmas que muestran crecimiento metastático o cualquier otra transformación como, por ejemplo, leucoplaquias las cuales preceden frecuentemente a la aparición de un cáncer. Las células y tejidos son cancerosos cuando crecen más rápidamente que las células normales, desplazándose o distribuyéndose en los tejidos sanos circundantes o cualquier otro tejido en el cuerpo descrito como crecimiento metastático, asumiendo formas y tamaños anormales, mostrando cambios en su relación nucleocitoplasmática, policromasia nuclear y finalmente pueden cesar. Las células y tejidos

- 45

cancerosos pueden afectar el cuerpo como un todo cuando causan síndromes paraneoplásticos o si un cáncer se presenta dentro de un órgano o tejido vital, cuya función normal será perturbada o impedida, con posibles resultados fatales. La involucración final de un órgano vital por el cáncer, bien sea primario o metastático, puede llevar a la muerte del mamífero afectado. El cáncer tiende a distribuirse, y el grado de su distribución está relacionado usualmente con las oportunidades del individuo para sobrevivir a la enfermedad. Se considera que en general los cánceres están en una de tres etapas de crecimiento: temprana, o localizada, cuando un tumor está confinado aún al tejido de origen, o sitio primario; extensión directa, donde las células cancerosas del tumor han invadido tejidos adyacentes o se han esparcido solamente a nódulos linfáticos regionales; o metástasis, en la cual las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo a partir del tejido primario, a través de los sistemas sanguíneo o linfático, y han establecido sitios de infección secundarios. Se dice que el cáncer es maligno por su tendencia a causar la muerte si no se trata. Los tumores benignos usualmente no producen la muerte, aunque pueden hacerlo si interfieren con una función normal del cuerpo en virtud de su localización, tamaño o efectos secundarios paraneoplásticos. Por lo tanto los tumores benignos caen bajo la definición de cáncer dentro del alcance de esta definición también. En general, las células cancerosas se dividen a una velocidad más alta que la de las células normales, pero la distinción entre el crecimiento de los tejidos cancerosos y normales no es tanto la rapidez de la división celular en las primeras como sí la pérdida parcial o completa de la restricción al crecimiento en las células cancerosas y en su incapacidad para diferenciarse en un tejido útil limitado del tipo que caracteriza el equilibrio funcional del crecimiento de los tejidos normales. Los tejidos cancerosos pueden expresar ciertos receptores moleculares y probablemente están influenciados por la susceptibilidad e inmunidad del huésped y se sabe que ciertos cánceres en seno y próstata, por ejemplo, se consideran dependientes de hormonas específicas para su existencia. El término "cáncer" bajo el alcance de la definición no está limitado a una neoplasia benigna simple sino que comprende cualquier otra neoplasia benigna y maligna como 1) Carcinoma, 2) Sarcoma, 3) Carcinosarcoma, 4) Cánceres de los tejidos formadores de sangre, 5) Tumores de los tejidos nerviosos incluyendo el cerebro, 6) Cáncer de las células de la piel. El cáncer de acuerdo con 1) se presenta en tejidos epiteliales, los cuales cubren el cuerpo externo (la piel) y recubren las membranas mucosas y las estructuras cavitarias internas de órganos, tales como por ejemplo, el seno, pulmones, los tractos respiratorio y gastrointestinal, las glándulas endocrinas y el sistema genitourinario. Pueden persistir elementos de ductos o glandulares en tumores epiteliales, tales como en adenocarcinomas, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de tiroides, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma uterino. Los cánceres del epitelio de células pavimentosas de la piel y de ciertas membranas mucosas, tales como por ejemplo cánceres de la lengua, labios, laringe, vejiga urinaria, cérvix uterina, o pene, pueden ser denominados carcinomas epidermoides o de células escamosas de los respectivos tejidos y están dentro del alcance de la definición de cáncer también. El cáncer de acuerdo a 2) se desarrolla en tejidos conectivos, incluyendo tejidos fibrosos, tejidos adiposos (grasa), músculos, vasos sanguíneos, huesos y cartílagos como, por ejemplo, el sarcoma osteogénico; liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma sinovial. El cáncer de acuerdo con 3) es un cáncer que se desarrolla tanto en tejidos epiteliales como conectivos. Las enfermedades de cáncer dentro del alcance de esta definición pueden ser primarias o secundarias, en donde primario indica que el cáncer es originado en el tejido donde es encontrado en vez de establecerse como sitio secundario a través de la metástasis a partir de otra lesión. Las enfermedades de cánceres y tumor dentro del alcance de esta definición pueden ser benignas o malignas y pueden afectar todas las estructuras anatómicas del cuerpo de un mamífero. Por ejemplo pero no limitándose a ello comprenden cánceres de enfermedades tumorales de I) de la médula ósea y de células derivadas de la médula ósea (leucemias), II) las glándulas endocrinas y exocrinas tales como, por ejemplo, tiroides, paratiroides, pituitaria, glándulas adrenales, glándulas salivares, páncreas, III) seno, por ejemplo, tumores benignos o malignos en las glándulas mamarias bien sea de un macho o una hembra, los ductos mamarios, adenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma comedo, enfermedad de Paget del pezón, carcinoma inflamatorio de la mujer joven, IV), el pulmón, V), el estómago, VI) el hígado y el bazo, VII) el intestino delgado, VIII) el colon, IX) los huesos y sus tejidos de soporte y conectivos tales como tumor óseo maligno o benigno, por ejemplo, sarcoma osteogénico maligno, osteoma benigno, tumores de cartílago; condrosarcoma similar a maligno o condroma benigno; tumores de la médula ósea tales como mieloma maligno o granuloma eosinofílico benigno, así como tumores metastáticos de tejidos óseos y otras localizaciones del cuerpo; X) la boca, garganta, laringe y esófago, XI) la vejiga urinaria y los órganos y estructuras internos y externos del sistema urogenital de machos y hembras tales como ovarios, úteros, cérvix del útero, testículos y glándula prostática, XII) la próstata, XIII) el páncreas, tal como el carcinoma de ductos del páncreas; XIV) el tejido linfático tales como linfomas u otros tumores de origen linfoide, XV) la piel, XVI) enfermedades de cáncer y tumores de todas las estructuras anatómicas que pertenecen a la respiración y al sistema respiratorio incluyendo los músculos torácicos y sus recubrimientos, XVII) cáncer primario o secundario de los nódulos linfáticos XVIII) la lengua y las estructuras óseas del paladar duro y los senos nasales, XIX) la boca, mejillas, cuello y glándulas salivares, XX) los vasos sanguíneos incluyendo el corazón y sus recubrimientos, XXI) los músculos lisos o esqueléticos y sus ligamentos y recubrimientos, XXII) el sistema nervioso periférico, el autónomo, el central incluyendo el cerebelo, XXIII), el tejido adiposo.

La AdipoR2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos de cáncer: tumor de estómago, tumor de recto, tumor de pulmón, tumor de seno. La expresión en los tejidos antes mencionados y en particular la expresión diferencial entre tejidos enfermos de tumor de estómago y un estómago saludable, entre tejidos enfermos de tumor de recto y tejidos de recto saludables, entre tejidos enfermos de tumor de pulmones y tejido de pulmones saludable, entre tejidos enfermos de tumor de seno y tejidos de seno saludables demuestran que la AdipoR2 humana o el ARNm mensajero humano pueden ser utilizados para diagnosticar el cáncer.

Enfermedades Inflamatorias

Las enfermedades inflamatorias comprenden enfermedades disparadas por mediadores celulares o no celulares del sistema inmune o tejidos que producen la inflamación de los tejidos del cuerpo y subsecuentemente producen una condición inflamatoria aguda o crónica. Ejemplos de tales enfermedades inflamatorias son las reacciones por hipersensibilidad del tipo I - IV, por ejemplo pero no limitándose a enfermedades por hipersensibilidad de los pulmones incluyendo asma, enfermedades atópicas, rinitis alérgica o conjuntivitis, angioedema de los párpados, angioedema hereditario, reacciones de hipersensibilidad antirreceptores y enfermedades autoinmunes, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, pémfigo, miastenia gravis, enfermedad de Grave y de Raynaud, diabetes tipo B resistente a la insulina, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad de Crohn, escleroderma, enfermedad de tejidos conectivos mixtos, polimiositis, sarcoidosis, glomerulonefritis, reacciones de huésped versus injerto agudas o crónicas.

La AdipoR2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos de los sistemas inmunes y tejidos que responden a los componentes del sistema inmune así como en los siguientes tejidos que responden a mediadores de la inflamación: neutrófilos de la sangre del cordón umbilical, neutrófilos de la sangre periférica, COPD de pulmón.

15 Trastornos relacionados con Pulmología

Se considera que el asma surge como resultado de interacciones entre múltiples factores genéticos y ambientales y se caracteriza por tres rasgos principales: 1) obstrucción intermitente y reversible de las vías respiratorias causada por broncoconstricción, producción incrementada de mucosas y engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias que lleva a un estrechamiento de las vías, 2) hiperrespuesta de las vías respiratorias, y 3) inflamación de las vías respiratorias. Ciertas células son críticas para la reacción inflamatoria del asma e incluyen células T y células que presentan el antígeno, células B que producen IgE y mastocitos, basófilos, eosinófilos y otras células que se enlazan a IgE. Estas células efectoras se acumulan en el sitio de la reacción alérgica en las vías respiratorias y liberan productos tóxicos que contribuyen a la patología aguda y eventualmente a la destrucción de los tejidos relacionados con el trastorno. Otras células residentes, tales como células musculares lisas, células epiteliales de pulmón, células productoras de moco y células nerviosas también pueden ser anormales en individuos con asma y pueden contribuir a su patología. Mientras que la obstrucción de las vías aéreas por parte del asma, que se presenta clínicamente como un resfriado intermitente y cortada de la respiración, es generalmente el síntoma más presionante de la enfermedad que requiere un tratamiento inmediato, la inflamación y destrucción de los tejidos asociada con la enfermedad puede llevar a cambios irreversibles que eventualmente convierten el asma en un trastorno crónico e incapacitante que requiere manejo a largo plazo.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (o de las vías respiratorias) (COPD) es una condición que se define fisiológicamente como la obstrucción al flujo del aire que es el resultado generalmente de una mezcla de enfisema y obstrucción periférica de las vías respiratorias debido a bronquitis crónica [Botstein, 1980]. El enfisema se caracteriza por la destrucción de las paredes alveolares que lleva al agrandamiento anormal de los espacios de aire en el pulmón. La bronquitis crónica se define clínicamente como la presencia de tos productiva crónica durante tres meses en cada uno de dos años sucesivos. En la COPD, la obstrucción del flujo de aire es usualmente progresiva y sólo parcialmente reversible. De lejos el factor de riesgo más importante para el desarrollo de COPD es el consumo de cigarrillos, aunque la enfermedad también se presenta en no fumadores.

La AdipoR2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos del sistema respiratorio: neutrófilos en la sangre del cordón umbilical, neutrófilos en sangre periférica, lóbulo superior derecho de los pulmones, lóbulo inferior derecho de los pulmones, tumor de pulmones, COPD de pulmones, tráquea, bronquios primarios, bronquios secundarios, células epiteliales bronquiales, células musculares lisas bronquiales. La expresión en los tejidos antes mencionados y en particular la expresión diferencial entre tejido enfermo de pulmones con COPD y tejido saludable de pulmones demuestra que la AdipoR2 o el ARNm humanos pueden utilizarse para diagnosticar las enfermedades respiratorias.

Trastornos relacionados con urología

Los trastornos genitourinarios comprenden trastornos benignos y malignos de los órganos que constituyen el sistema genitourinario masculino y femenino, enfermedades renales tales como fallo renal agudo o crónico, enfermedades renales mediadas inmunológicamente tales como rechazo a trasplante de riñón, lupus nefritis, enfermedades renales inmunes complejas, glomerulopatías, nefritis, nefropatía tóxica, uropatías obstructivas tales como hiperplasia prostática (BPH), síndrome de vejiga neurogénica, incontinencia urinaria tal como incontinencia súbita, por tensión o por sobreflujo, dolor pélvico y disfunción eréctil.

La AdipoR2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos urológicos: médula espinal (cuerno ventral), próstata, BPH de próstata. La expresión en los tejidos antes mencionados y en particular la expresión diferencial entre tejido enfermo de BPH de próstata y tejido sano de próstata demuestra que la AdipoR2 o el ARNm humanos pueden ser utilizados para diagnosticar los trastornos urológicos.

La AdipoR2 humana se expresa altamente en tejidos de la médula espinal: médula espinal (cuerno ventral).

Diagnóstico

En la invención, los polinucleótidos que codifican AdipoR2 se utilizan para propósitos de diagnóstico. Los polinucleótidos que pueden ser usados incluyen secuencias de oligonucleótidos, moléculas de ARN y ADN complementarios y PNA. Los polinucleótidos pueden ser utilizados para detectar y cuantificar la expresión genética en tejidos sometidos a biopsia, en los cuales la expresión de AdipoR2 puede correlacionarse con la enfermedad. La prueba diagnóstica puede ser utilizada para distinguir entre ausencia, presencia y exceso de expresión de AdipoR2, y para monitorear la regulación de los niveles de AdipoR2 durante la intervención terapéutica.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican AdipoR2 pueden utilizarse para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares, enfermedades dermatológicas, enfermedades gastroenterológicas, cáncer, enfermedades hematológicas, enfermedades respiratorias, inflamación, enfermedades neurológicas, enfermedades urológicas, asociadas con la expresión de AdipoR2. Las secuencias de polinucleótidos que codifican AdipoR2 pueden utilizarse en análisis de inmunoprecipitación Southern, Northern o por siembra, u otras tecnologías basadas en las membranas; en las tecnologías de PCR; en las pruebas de inmersión, punta y ELISA, y en fluidos o tejidos que utilizan microdisposiciones a partir de biopsias de pacientes para detectar expresión alterada de AdipoR2. Tales métodos cualitativos o cuantitativos son bien conocidos en el arte.

En un aspecto particular, las secuencias de nucleótidos que codifican AdipoR2 pueden ser útiles en ensayos que detectan la presencia de trastornos asociados, particularmente los mencionados más arriba. Las secuencias de nucleótidos que codifican AdipoR2 pueden ser marcadas por métodos estándar y agregadas a una muestra de fluido o tejido de un paciente bajo condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un período de incubación adecuado, la muestra se lava y se cuantifica y compara la señal con un valor estándar. Si la cantidad de señal en la muestra del paciente se altera significativamente con relación a la de una muestra de control comparable, las secuencias de nucleótidos que hibridado con secuencias de nucleótidos en la muestra, y la presencia de niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican AdipoR2 en la muestra indica la presencia del trastorno asociado. Tales pruebas también pueden utilizarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico en particular en estudios en animales, en ensayos clínicos, o en el monitoreo del tratamiento de un paciente individual.

Con el fin de proveer una base para el diagnóstico del cáncer asociado con la expresión de AdipoR2, se establece un perfil normal o estándar para la expresión. Esto puede lograrse combinando fluidos corporales o extractos de células tomados a partir de sujetos normales, bien sea animales o humanos, con una secuencia, o un fragmento de la misma, que codifica AdipoR2 bajo condiciones adecuadas para hibridación o amplificación. La hibridación estándar puede ser cuantificada comparando los valores obtenidos a partir de sujetos normales con valores de un experimento en el cual se usa una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Los valores obtenidos a partir de muestras normales pueden compararse con valores obtenidos a partir de muestras de pacientes que son sintomáticos para un trastorno. La desviación de los valores estándar se utiliza para establecer la presencia de un trastorno.

Un objeto de la invención es un método para diagnosticar una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistente de enfermedades cardiovasculares, enfermedades dermatológicas, enfermedades gastroenterológicas, cáncer, enfermedades hematológicas, enfermedades respiratorias, inflamación, enfermedades neurológicas, enfermedades urológicas, en un mamífero que comprende las etapas de (i) determinar la cantidad de polinucleótido de AdipoR2 en una muestra tomada de dicho mamífero, (ii) determinar la cantidad de polinucleótido de AdipoR2 en el mamíferos saludable y/o enfermo. Se diagnostica una enfermedad, por ejemplo, si hay una similitud sustancial en la cantidad de polinucleótido de AdipoR2 en dicho mamífero de prueba en comparación con un mamífero enfermo.

Los ejemplos a continuación se proveen para ilustrar el objeto de la invención. Estos ejemplos se proveen a manera de ilustración y no se incluyen para propósitos de limitar la invención.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos públicas de secuencias.**

El grado de homología puede ser calculado fácilmente por métodos conocidos. Los métodos preferidos para determinar la homología se designan para dar la coincidencia máxima entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la homología se codifican en programas de ordenador disponibles públicamente tales como BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA. Los programas BLAST están disponibles públicamente en la NCBI y otras fuentes en Internet.

Para AdipoR2 se identificaron las siguientes coincidencias con secuencias conocidas usando el algoritmo BLAST [Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ; Nucleic Acids Res 1997 Sep 1; 25(17): 3389-402] y los siguientes conjuntos de parámetros: matriz = BLOSUM62 y filtro de baja complejidad. Se investigaron las siguientes bases de datos: NCBI (base de datos no redundante) y base de datos de patentes Derwent (GeneSeq).

## ES 2 386 440 T3

Se encontraron las siguientes coincidencias:

- >dbj|AK127196.1| Homo sapiens cDNA FLJ45261 fis, clon BRHIP2021929  
Longitud = 4012, Conteo = 6570 bits (3417), Esperado = 0.0, Identidades = 3458/3485 (99%), Brechas = 1/3485 (0%)
- 5 >dbj|AK128511.1| Homo sapiens cDNA.FLJ46666 fis, clon TRACH3007625  
Longitud = 4018, Conteo = 6553 bits (3408), Esperado = 0.0, Identidades = 3455/3485 (99%), Brechas = 1/3485 (0%)
- >NA2002:ABL90191 Ab190191 Polinucleótido humano SEQ ID NO 753. 5/2002  
10 Longitud = 3762, Conteo = 6493 bits (3377), Esperado = 0.0, Identidades = 3449/3488 (98%), Brechas = 6/3488 (0%)
- >gb|BC004906.2| Homo sapiens cDNA clon IMAGE:3529257, partial cds  
Longitud = 1638, Conteo = 2984 bits (1552), Esperado = 0.0, Identidades = 1583/1605 (98%), Brechas = 1/1605 (0%)
- >NA2001A:AAK52423 Aak52423 Polinucleótido humano SEQ ID NO 968. 11/2001  
15 Longitud = 1360, Conteo = 2463 bits (1281), Esperado = 0.0, Identidades = 1285/1287 (99%)
- >gb|BC051858.2| Homo sapiens receptor 2 de adiponectina, mRNA (cDNA clon MGC:60215IMAGE:6527208), complete cds  
Longitud = 1573, Conteo = 2065 bits (1074), Esperado = 0.0, Identidades = 1076/1077 (99%)
- >NA2001A:AAK53407 Aak53407 Polinucleótido humano SEQ ID NO 2936.11/2001  
20 Longitud = 1086, Conteo = 1973 bits (1026), Esperado = 0.0, Identidades = 1047/1050 (99%), Brechas = 3/1050 (0%)
- >NA2001A:AAI95615 Aai95615 Polinucleótido humano expresado en neuroblastoma SEQ ID NO 1690. 11/2001  
Longitud = 728, Conteo = 1229 bits (639), Esperado = 0.0, Identidades = 698/708 (98%), Brechas = 8/708 (1%)
- >dbj|BD099390.1| Genes novedosos clonados en neuroblastoma humano y fragmentos del mismo  
25 Longitud = 728, Conteo = 1229 bits (639), Esperado = 0.0, Identidades = 698/708 (98%), Brechas = 8/708 (1%)
- >dbj|BD019452.1| Gen novedoso y fragmento de gen novedoso clonado en neuroblastoma humano  
Longitud = 728, Conteo = 1229 bits (639), Esperado = 0.0, Identidades = 698/708 (98%), Brechas = 8/708 (1%)
- >NA2000:AAA02612 Aaa02612 Secuencia de polinucleótidos de línea celular de cancer de colon SEQ ID NO:2603. 5/2000  
30 Longitud = 707, Conteo = 1225 bits (637), Esperado = 0.0, Identidades = 671/682 (98%), Brechas = 3/682 (0%)

### Ejemplo 2: perfil de expresión

- El ARN celular total fue aislado a partir de células mediante uno de dos métodos estándar: 1) centrifugación por gradiente de densidad con isotiocianato de guanidina/cloruro de cesio [Kellogg, (1990)]; o con el protocolo de Tri-Reagent de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio). El ARN total preparado por el protocolo de Tri-Reagent fue tratado con ADNasa I para eliminar la contaminación con ADN genómico.
- 35

- Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm del AdipoR2, el ARN de cada fuente de célula o tejido fue sometido a transcripción reversa primero. 85 µg de ARN total fueron sometidos a transcripción reversa utilizando 1 µmol de cebadores hexámeros aleatorios, 0.5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Qiagen, Hilden, Alemania), 3000 U de RnaseQut (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) en un volumen final de 680 µl. El primer regulador de síntesis de cadena y la transcriptasa reversa Omniscript (2 U/µl) fueron de (Qiagen, Hilden, Alemania). La reacción fue incubada a 37°C durante 90 minutos y enfriada sobre hielo. El volumen se ajustó a 6800 µl con agua, produciendo una concentración final de 12.5 ng/µl del ARN de partida.
- 40

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de AdipoR2 en células y tejidos se utilizó el sistema 7900 HT Sequence Detection de Applied Biosystem o se utilizó el Biorad iCycler de acuerdo con las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR fueron fijadas para cuantificar AdipoR2 y los genes de mantenimiento HPRT (hipoxantina fosforribosiltransferasa), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa),  $\beta$ -actina, y otros: Los cebadores de avance y retroceso y las sondas para AdipoR2 fueron diseñados utilizando el software Perkin Elmer ABI Primer Express™ y se sintetizaron en TibMolBiol (Berlín, Alemania). La secuencia del cebador de avance de AdipoR2: Cebador1 (SEQ ID NO: 3). La secuencia del cebador reverse de AdipoR2 fue Cebador2 (SEQ ID NO: 4). Sonda 1 (SEQ ID NO: 5), marcada con FAM (carboxifluoresceína succinimidil éster) como pigmento informador y TAMRA (carboxitetrametilrodamina) como detenedor, que se utiliza como una sonda para AdipoR2. Se prepararon los siguientes reactivos en un total de 25  $\mu$ l: 1x TaqMan buffer A, 55 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM de dATP, dCTP, dGTP, y dUTP, 0.025 U/PI AmpliTaq Gold™, 0.01 U/PI AmpErase y Sonda 1 (SEQ ID NO: 4), cebadores de avance y retroceso de AdipoR2 cada uno a 200 nM, 200 nM de AdipoR2 FAM/TAMRA como sonda marcada con éste, y 5  $\mu$ l de ADNc Patrón. Los parámetros de la ciclización térmica fueron 2 minutos a 50°C, seguidos por 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de fusión a 95°C durante 15 segundos y fusión/extensión a 60° durante 1 minuto.

Cálculo de los valores CT corregidos

El valor CT (ciclo de umbral) se calcula como se describe en la sección "determinación cuantitativa de ácidos nucleicos". El valor CF (factor para la corrección del ciclo de umbral) se calcula como sigue:

1. Las reacciones de PCR fueron fijadas para cuantificar los genes de mantenimiento (HKG) para cada muestra de ADNc
2. Los valores CT<sub>HKG</sub> (ciclo umbral para el gen de mantenimiento) fueron calculados tal como se describe en la sección de "determinación cuantitativa de ácidos nucleicos".
3. Los valores medios de CT<sub>HKG</sub>- (valor medio CT de todos los HKG probados en el ADNc) de todos los HKG para cada ADNc se calculan (n = número de HKG):  $CT_{HKG-n}\text{-valor medio} = (\text{valor } CT_{HKG1} + \text{valor } CT_{HKG2} + \dots + \text{valor } CT_{HKGn}) / n$
4. Valor medio de CT<sub>panel</sub> (valor medio de CT de todos los HKG en todos los ADNc probados) =  $(CT_{HKG1}\text{-valor medio} + CT_{HKG2}\text{-valor medio} + \dots + CT_{HKG-y}\text{-valor medio}) / y$  (y = número de cDNAs)
5. CF<sub>cDNA-n</sub> (factor de corrección para cDNA n) =  $CT_{panel}\text{-valor medio} - CT_{HKG-n}\text{-valor medio}$
6. CT<sub>ADNc-n</sub> (valor CT del gen probado para el n ADNc) + CF<sub>cDNA-n</sub> (factor de corrección para ADNc n) = CT<sub>cor-cDNA-n</sub> (valor CT corregido para un gen sobre ADNc n)

Cálculo de la expresión relativa

Definición: CT<sub>cor-cDNA-n</sub> más alto  $\neq$  40 se define como CT<sub>cor-cDNA</sub> [alta] Expresión Relativa =  $2^{(CT_{cor-cDNA[high]} - CT_{cor-cDNA-n})}$

Tejidos

La expresión de AdipoR2 fue investigada en los tejidos listados en la tabla 1

Perfil de expresión

Los resultados de la cuantificación de ARNm (perfil de expresión) se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Expresión relativa de AdipoR2 en diversos tejidos humanos

corazón fetal	7
corazón	3
corazón	105
corazón	28
pericardio	208
atrio del corazón (derecho)	37
atrio del corazón (derecho)	10
atrio del corazón (izquierdo)	315
atrio del corazón (izquierdo)	5
ventrículo del corazón (izquierdo)	113
ventrículo del corazón (izquierdo)	5
ventrículo del corazón (derecho)	452
ventrículo del corazón (derecho)	57
ápice del corazón	11
Fibras de Purkinje	8
septum interventricular	41
aorta fetal	9
aorta	190
aorta	1
aorta	6
válvula de la aorta	2
arteria	10
arteria coronaria	38
arteria coronaria	30

(continuación)

arteria coronaria	145
arteria pulmonar	6
arteria carótida	6
arteria mesentérica	2557
arteria radialis	2
vena	8
válvula pulmonar	13
vena (safena magna)	367
vena (cava)	588
células endoteliales de la arteria coronaria	1060
células primarias de músculos lisos de la arteria coronaria	75
células musculares lisas aórticas	1
células musculares lisas de la arteria pulmonar	1
células endoteliales aórticas	1314
células HUVEC	46
células endoteliales de la arteria pulmonar	2
células endoteliales de arteria iliaca	9
piel	488
glándula adrenal	1992
tiroides	115
tumor tiroidal	97
páncreas	147
cirrosis de páncreas e hígado	29
esófago	25

(continuación)

tumor esofágico	8
estómago	729
tumor del estómago	28
colon	64
tumor de colon	109
intestino delgado	2759
íleo	19
tumor del íleo	33
inflamación crónica del íleo	11
recto	545
tumor del recto	1342
hígado fetal	7
hígado	32
hígado	66
hígado	18
cirrosis de hígado	95
enfermedad de lupus del hígado	12
tumor en hígado	28
células HEP G2	179
leucocitos (sangre periférica)	22
Jurkat (células T)	62
Raji (células B)	15
médula ósea	52
eritrocitos	644

(continuación)

linfonodos	6
timo	3
trombocitos	10
células estromales de la médula ósea	2
células CD71+ de la médula ósea	63
células CD33+ de la médula ósea	2
células CD34+ de la médula ósea	116
células CD15+ de la médula ósea	24
células CD15+ de la sangre del cordón umbilical	76
células CD34+ de la sangre del cordón umbilical	699
neutrófilos de la sangre del cordón umbilical	333
células T de sangre periférica CD4+	63
células T de sangre periférica CD8+	199
monocitos de sangre periférica CD14+	23
células B de sangre periférica CD19+	120
neutrófilos de sangre periférica	355
Bazo	4
cirrosis de bazo e hígado	34
músculo esquelético	690
Cartílago	7
tejido óseo conectivo	5
Adipositos	113
Cerebro	407
Cerebelo	221

(continuación)

córtex cerebral	87
lóbulo frontal	67
lóbulo occipital	163
lóbulo parietal	393
lóbulo temporal	215
substantia nigra	76
Caudatum	14
corpus callosum	133
nucleus accumbens	1795
putamen	4640
hipocampo	184
Tálamo	224
tálamo posteroventral	3541
tálamo dorsal medio	8023
hipotálamo	13
raíces de ganglios dorsales	23
médula espinal	224
médula espinal (cuerno ventral)	11191
médula espinal (cuerno dorsal)	350
células H4 de tumor glial	137
células neurales progenitoras	307
astrocitos	171
retina	461
pulmón fetal	53

(continuación)

células IMR-90 de fibroblastos de pulmón fetal	15
células MRC-5 de fibroblasto de pulmón fetal	1
pulmón	14
pulmón	48
pulmón	7
lóbulo superior derecho del pulmón	239
lóbulo medio derecho del pulmón	118
lóbulo inferior derecho del pulmón	228
enfermedad de lupus pulmonar	5
tumor de pulmón	169
COPD de pulmón	498
Tráquea	719
bronquios primarios	1820
bronquios secundarios	1585
células epiteliales bronquiales	2856
células musculares lisas bronquiales	261
células epiteliales pequeñas de las vías respiratorias	15
cérvix	32
testículos	781
células HeLa (tumor de cérvix)	19
placenta	5
útero	8
tumor de útero	13
ovario	175

(continuación)

tumor de ovario	36
seno	320
tumor de seno	80
glándula mamaria	6
próstata	1128
próstata	826
próstata	3
BPH de próstata	422
tumor de próstata	73
vejiga	43
vejiga	9
vejiga	10
uréter	118
pene	132
corpus cavernosum	15
riñón fetal	147
riñón	4
riñón	12
riñón	11
tumor de riñón	5
células epiteliales renales	3
células HEK 293	276

**Ejemplo 3: Análisis antisentido (no es parte de la invención reivindicada):**

5 El conocimiento de la secuencia correcta completa de ADNc que codifica para AdipoR2 permite su uso como una herramienta para la tecnología antisentido en la investigación de la función genética. Los oligonucleótidos, el ADNc o los fragmentos genómicos que comprenden la cadena antisentido de un polinucleótido que codifica para AdipoR2 se utilizan bien sea in vitro o in vivo para inhibir la traducción del ARNm. Tal tecnología, es bien conocida ahora en el arte, y las moléculas antisentido pueden diseñarse en diversas localizaciones a lo largo de las secuencias de nucleótidos. Mediante el tratamiento de las células o de animales de prueba completos con tales secuencias antisentido, el gen de interés se inactiva con efectividad. Frecuentemente, la función del gen se establece mediante la observación del comportamiento a nivel intracelular, celular, de tejido o de organismo (por ejemplo, letalidad, pérdida de función diferenciada, cambios en morfología, etc.)

10 Además de utilizar secuencias construidas para interrumpir la transcripción de un marco de lectura abierto en particular, las modificaciones de la expresión genética se obtienen diseñando secuencias antisentido para regiones de intrones, elementos promotores/potenciadores, o aún para hacer transacción de genes reguladores.

**Ejemplo 4: Expresión de AdipoR2 (no hace parte de las invenciones reivindicadas)**

La expresión de AdipoR2 se logra subclonando el ADNc en vectores de expresión apropiados y haciendo transfección de los vectores en huéspedes de expresión tales como, por ejemplo, E. coli. En un caso particular, el vector se manipula de tal manera que contienen un promotor para  $\beta$ -galactosidasa, corriente arriba del sitio de clonación, seguido por una secuencia que contiene la metionina amino-terminal y los subsecuentes siete residuos de la  $\beta$ -galactosidasa. Inmediatamente después de estos ocho residuos hay un promotor bacteriófago manipulado útil para cebar y transcribir artificialmente y proveer un número de sitios de restricción exclusivos de endonucleasa para la clonación.

La inducción de la cepa bacteriana transfectada con isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) utilizando métodos estándar produce una proteína de fusión correspondiente a los primeros siete residuos de la  $\beta$ -galactosidasa, aproximadamente 15 residuos del "enlazante" y el péptido codificado en el ADNc. Puesto que los insertos del clon de ADNc se generan mediante un proceso esencialmente aleatorio, hay una probabilidad del 33% de que el ADNc incluido caiga en el marco de lectura correcto para una traducción apropiada. Si el ADNc no está en el marco de lectura apropiado, se obtienen por eliminación o inserción del número apropiado de bases utilizando métodos bien conocidos incluyendo mutagénesis in vitro, digestión con exonucleasa III o nucleasa de soja, o la inclusión de un enlazante oligonucleótido de longitud apropiada.

El ADNc de la AdipoR2 se transfiere hacia otros vectores conocidos por su utilidad para la expresión de proteínas en huéspedes específicos. Los cebadores de oligonucleótidos que contienen sitios de clonación así como un segmento de ADN (aproximadamente 25 bases) suficiente para hibridizar los extremos en ambos extremos del ADNc objetivo se sintetiza químicamente por métodos estándar. Estos cebadores se utilizan entonces para amplificar el segmento genético deseado por PCR. El segmento genético resultante se digiere con enzimas de restricción apropiadas bajo condiciones estándar y se aísla mediante electroforesis por gel. Alternativamente, se producen segmentos genéticos similares por ingestión del ADNc con enzimas de restricción apropiadas. Utilizando cebadores apropiados, algunos segmentos de secuencias de codificación de más de un gen se ligan entre sí y se clonan en vectores apropiados. Es posible optimizar la expresión mediante la construcción de tales secuencias quiméricas.

Los huéspedes de expresión adecuados para tales moléculas quiméricas incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO) y células humanas 293, células de insectos tales como células Sf9, células de levaduras tales como células de *Saccharomyces cerevisiae* y células bacterianas tales como E. coli. Para cada uno de estos sistemas celulares, un vector de expresión útil incluye también un origen de replicación para permitir la propagación en bacterias, y un marcador seleccionable tal como el gen de resistencia al antibiótico  $\beta$ -lactamasa para permitir la selección de plásmidos en bacterias. Además, el vector puede incluir un segundo marcador seleccionable tal como el gen de la neomicina fosfotransferasa para permitir la selección en células huésped eucariotes transfectadas. Los vectores para uso en los huéspedes de expresión eucariotes requieren elementos de procesamiento de ARN tales como secuencias de 3' poliadenilación si tales no son parte del ADNc de interés.

Adicionalmente, el vector contiene promotores o potenciadores que incrementan la expresión genética. Tales promotores son específicos del huésped e incluyen MMTV, SV40 y promotores de metalotionina para las células CHO; promotores trp, lac, tac y T7 para huéspedes bacterianos; y promotores del factor alfa, alcohol oxidasa y PGH para levaduras. Los potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus de Rous sarcoma, se utilizan en células huésped de mamíferos. Una vez que se obtienen cultivos homogéneos de células recombinantes a través de métodos de cultivo estándar, se recuperan grandes cantidades del AdipoR2 producidos por recombinación a partir del medio condicionado y analizado utilizando métodos cromatográficos conocidos en el arte. Por ejemplo, la AdipoR2 puede ser clonada en el vector de expresión pcADN3, tal como se ejemplifica aquí. Este producto puede ser utilizado para transformar, por ejemplo, HEK293 o COS por metodología estándar en el arte. Específicamente, por ejemplo, utilizando transferencia de genes mediada por Lipofectamine (Gibco BRL catálogo No. 18324-020).

**Ejemplo 5: Aislamiento de AdipoR2 recombinante (no hace parte de la invención reivindicada)**

La AdipoR2 se expresa como una proteína quimérica con uno o más dominios de polipéptidos adicionales agregados para facilitar la purificación de las proteínas. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelatantes de metales tales como módulos histidina-triptófano que permiten la purificación de metales inmovilizados [Appa Rao, 1997] y el dominio utilizado en el sistema de purificación FLAGS de extensión/afinidad (Immunex Corp., Seattle, Washington). La inclusión de una secuencia enlazadora escindible tal como Factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) entre el dominio de purificación y la secuencia de AdipoR2 es útil para facilitar la expresión de AdipoR2.

**Ejemplo 6: Prueba de los GPCR quiméricos (no hace parte de la invención reivindicada)**

Los GPCR quiméricos funcionales se construyen combinando las secuencias receptoras extracelulares de una nueva isoforma con los segmentos transmembranales e intracelulares de una isoforma conocida para propósitos de prueba. Este concepto fue demostrado por Kobilka et al. (1988), Science 240:1310-1316) quien creó una serie de

receptores quiméricos  $\alpha 2$ - $\beta 2$  adrenérgicos (AR) insertando cantidades progresivamente más grandes de la secuencia transmembranal  $\alpha 2$ -AR en  $\beta 2$ -AR. La actividad de enlazamiento de los agonistas conocidos cambió a medida que la molécula se desplazaba desde tener más una conformación  $\alpha 2$  que  $\beta 2$ , y los constructos intermedios demostraron una especificidad mixta. La especificidad para el enlazamiento de antagonistas, sin embargo, se correlacionó con la fuente del dominio VII. La importancia del dominio T7G VII para el reconocimiento de ligandos también se encontró en quimeras utilizando dos receptores de levadura del factor  $\alpha$  y es significativo porque los receptores de levadura se clasifican como receptores misceláneos. Así, el papel funcional de los dominios específicos parece estar preservado a través de la familia de GPCR independientemente de la categoría.

En una forma paralela, se intercambian segmentos internos o dominios citoplasmáticos de una isoforma particular, con los dominios análogos de un GPCR conocido y se utiliza para identificar los determinantes estructurales responsables para el acoplamiento de los receptores a las proteínas G triméricas. Un receptor quimérico en el cual los dominios V, VI y el bucle conector intracelular de  $\beta 2$ -AR fueron sustituidos en  $\alpha 2$ -AR demostrándose el enlazamiento de ligandos con especificidad para  $\alpha 2$ -AR, pero para estimular la adenilato ciclasa en la forma del  $\beta 2$ -AR. Esto demuestra que para los receptores tipo adrenérgico, el reconocimiento de la proteína G está presente en los dominios V y VI y en su bucle conector. La situación opuesta fue predicha y observada para una quimera en la cual el bucle V->VI de  $\alpha 1$ -AR reemplazó el dominio correspondiente sobre  $\beta 2$ -AR y el receptor resultante enlazó los ligandos con la especificidad de  $\beta 2$ -AR y activó el rendimiento de fosfatidilinositol mediado por proteína G en la forma de  $\alpha 1$ -AR. Finalmente, las quimeras construidas a partir de receptores muscarínicos también demostraron que el loop V->VI es el determinante principal para la especificidad de la actividad de proteína G.

Los GPCR quiméricos o modificados que contienen sustituciones en las regiones extracelulares y transmembranales han demostrado que estas porciones del receptor determinan la especificidad de enlazamiento al ligando. Por ejemplo, dos residuos de serina conservados en el dominio V de todos los GPCR adrenérgicos y de catecolamina D son necesarios para una actividad agonista potente. Se considera que estas serinas forman puentes de hidrógeno con la unidad estructural catecol de los agonistas dentro del sitio de enlazamiento de GPCR. De la misma forma, un residuo Asp presente en el dominio III de todos los GPCR que se enlazan con amins biogénicas forman, según se cree, un par iónico con el grupo amina del ligando en el sitio de enlazamiento de GPCR.

Los clones GPCR funcionales se expresan en sistemas de expresión heterólogos y se establece su actividad biológica. Un sistema heterólogo introduce genes para GPCR de mamíferos y una proteína G de mamíferos en células de levadura. El GPCR muestra tener especificidad y afinidades apropiada para los ligandos y dispara una activación biológica apropiada (detención del crecimiento y cambios morfológicos) de las células de levadura.

Un procedimiento alternativo para probar los receptores quiméricos se basa en el procedimiento que utiliza el receptor purinérgico ( $P_{2u}$ ). La función se prueba fácilmente en células de leucemia humana K562 cultivadas puesto que estas células carecen de receptores  $P_{2u}$ . Las células K562 se transfectan con vectores de expresión que contienen  $P_{2u}$  normal o quimérico y se cargan con fura-a, sonda fluorescente para  $Ca^{++}$ . La activación de los receptores  $P_{2u}$  apropiadamente ensamblados y funcionales con UTP o ATP extracelular moviliza el  $Ca^{++}$  intracelular el cual reacciona con fura-a y se mide espectrofluorométricamente.

Como sucede con los GPCR más arriba, los genes quiméricos se crean combinando secuencias de los segmentos extracelulares receptores de cualquier polipéptido nuevo GPCR con los nucleótidos para los segmentos de transmembrana e intracelulares de la molécula de  $P_{2u}$  conocida. Al bañar las células K562 transfectadas en micropozos que contienen ligandos apropiados se dispara el enlazamiento y la actividad fluorescente que define los efectores de la molécula de GPCR. Una vez que se establecen el ligando y la función, el sistema  $P_{2u}$  es útil para definir antagonistas o inhibidores que bloquean el enlazamiento y evitan tales reacciones fluorescentes.

#### **Ejemplo 7: Producción de anticuerpos específicos de AdipoR2 (no hace parte de la invención reivindicada)**

Se utilizan dos metodologías para obtener anticuerpos de AdipoR2, y cada metodología es útil para generar bien sea anticuerpos policlonales o monoclonales. En una metodología, la proteína desnaturalizada a partir de separación por HPLC en fase reversa se obtiene en cantidades de hasta 75 mg. Esta proteína desnaturalizada se usa para inmunizar ratones o conejos utilizando protocolos estándar; aproximadamente 100  $\mu$ g son adecuados para la inmunización de un ratón, mientras que hasta 1 mg podría ser utilizado para inmunizar un conejo. Para identificar hibridomas de ratón, la proteína desnaturalizada es radioyodada y luego utilizado para seleccionar hibridomas de células B murinas potenciales para aquellas que producen el anticuerpo. El procedimiento requiere solamente pequeñas cantidades de proteína, de tal manera que 20 mg son suficientes para marcar y seleccionar varios miles de clones.

En una segunda metodología, la secuencia de aminoácidos de un dominio de AdipoR2 apropiado, tal como se deduce de una traducción del ADNc, se analiza para determinar regiones de alta antigenicidad. Los oligopéptidos que comprenden regiones hidrofílicas apropiadas se sintetizan y usan en protocolos de inmunización adecuados para obtener anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos óptimas para la inmunización están usualmente en el terminal C, el terminal N y aquellas regiones hidrofílicas que intervienen del polipéptido que probablemente estén expuestas al ambiente externo cuando la proteína está en su conformación natural.

Típicamente, los péptidos seleccionados, aproximadamente de 15 residuos de longitud, se sintetizan utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer Model 431A utilizando química Fmoc y acoplándose con hemocianina de lapa (KLH, Sigma, St. Louis, MO) por reacción con M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster, MBS. Si es necesario, se introduce una cisteína en el terminal N del péptido para permitir el acoplamiento con KLH. Los conejos se inmunizan con el complejo péptido-KLH en adyuvante de Freund completo. Los antisueros resultantes se prueban en cuanto a la actividad anti-peptídica enlazando el péptido a un plástico, bloqueando con albúmina de suero bovino al 1%, haciendo reaccionar con el antisuero, lavando y haciendo reaccionar con IgG de cabra anticonejo específica purificada por afinidad marcada (radioactiva o fluorescente).

Los hibridomas se preparan y seleccionan utilizando técnicas estándar. Los hibridomas de interés se detectan seleccionando con AdipoR2 marcado para identificar aquellas fusiones que producen el anticuerpo monoclonal con la especificidad deseada. En un protocolo típico, los pozos de las placas (FAST; Becton-Dickinson, Palo Alto, California) se recubren durante la incubación con anticuerpos antirratón (o antiespecies adecuadas 1 g) de conejo específicos purificados por afinidad a 10 mg/ml. Los pozos recubiertos se bloquean con albúmina de suero bovino al 1%, (BSA), lavados e incubados con sobrenadantes de los hibridomas. Después de lavar los pozos se incuban con AdipoR2 marcado a 1 mg/ml. Los sobrenadantes con anticuerpos específicos enlazan más AdipoR2 marcado de lo que es detectable como señal de fondo. Entonces los clones que producen anticuerpos específicos se expanden y someten a dos ciclos de clonación en dilución limitante. Los hibridomas clonados se inyectan en ratones tratados con pristano para producir ascites, y el anticuerpo monoclonal se purifica a partir del fluido ascítico de los ratones por cromatografía de afinidad sobre proteína A. Los anticuerpos monoclonales con afinidades de al menos  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , preferiblemente  $10^9$  hasta  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  o más fuerte, se hacen típicamente por procedimientos estándar.

#### **Ejemplo 8: Prueba de Diagnóstico utilizando anticuerpos específicos de AdipoR2 (no hace parte de la invención reivindicada)**

Los anticuerpos de AdipoR2 particulares son útiles para la investigación de la transducción de señales y el diagnóstico de condiciones infecciosas o hereditarias que se caracterizan por diferencias en la cantidad o distribución de AdipoR2 o de los productos corriente abajo de una cascada de señalización activa.

Las pruebas de diagnóstico para AdipoR2 incluyen métodos que utilizan anticuerpos y un marcador para detectar AdipoR2 en fluidos corporales humanos, membranas, células, tejidos o extractos de los mismos. Los polipéptidos y anticuerpos se utilizan con o sin modificación. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcan para unirlos, bien sea en forma covalente o no covalente con una sustancia que provee una señal detectable. Se conoce una variedad amplia de marcadores y conjugación y se ha reportado extensamente tanto en la literatura científica como en patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, partículas magnéticas y similares.

En la técnica se conoce una variedad de protocolos para medir AdipoR2 soluble o enlazado a membrana, bien sea utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteína. Ejemplos incluyen el ensayo de inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y selección celular activada fluorescente (FACS). Un inmunoensayo con base monoclonal de dos sitios utilizando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítopos no interferentes sobre AdipoR2 es el preferido, pero también puede emplearse un ensayo de enlazamiento competitivo.

#### **Ejemplo 9: Purificación de AdipoR2 nativo usando anticuerpos específicos (no hace parte de la invención reivindicada)**

La AdipoR2 nativo o recombinante se purifica por cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos específicos para AdipoR2. En general, se construye una columna de inmunoafinidad acoplado covalentemente el anticuerpo anti-TRH a una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes bien sea por precipitación con sulfato de amonio o por purificación sobre proteína A inmovilizada. (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway NJ) de la misma forma, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de fluido de ascites de ratón por precipitación con sulfato de amonio o cromatografía sobre proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina purificada parcialmente se enlaza covalentemente a una resina cromatográfica tal como Sepharose activada con CNBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea, y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tales columnas de inmunoafinidad se utilizan en la purificación de AdipoR2 preparando una fracción a partir de células que contienen AdipoR2 en una forma soluble. Esta preparación se somete a derivación por solubilización de las células completas o de una fracción subcelular obtenida a través de centrifugación diferencial (con o sin la adición de detergente) o por otros métodos bien conocidos en la técnica: Alternativamente, la AdipoR2 soluble que contiene una secuencia de señales se secreta en cantidades útiles en el medio en el cual se cultivan las células.

Una preparación que contiene AdipoR2 soluble se pasa sobre la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava bajo condiciones que permiten la absorción preferencial de AdipoR2 (por ejemplo, reguladores de alta fuerza

iónica en presencia de detergente). Luego, la columna es eluida bajo condiciones que perturban el enlazamiento anticuerpo/proteína (por ejemplo, un buffer de pH 2-3 o una alta concentración de un caótropro, tal como urea o ion tiocianato), y se recolecta la AdipoR2.

**Ejemplo 10: Selección de fármacos (no hace parte de la invención reivindicada)**

5 El ejemplo describe métodos útiles para la selección de compuestos terapéuticos utilizando AdipoR2 o fragmentos de enlazamiento del mismo en una variedad de técnicas de selección de fármacos. Puesto que la AdipoR2 es un receptor acoplado a proteína G cualquiera de los métodos utilizados comúnmente en la técnica pueden usarse potencialmente para identificar ligandos de AdipoR2. Por ejemplo, la actividad de un receptor acoplado a proteína G tal como AdipoR2 puede medirse utilizando cualquiera de una variedad de ensayos funcionales en los cuales la activación del sector da como resultado un cambio observable en el nivel de algún sistema de mensajero secundario, tal como una adenilato ciclasa, guanilciclasa, movilización de calcio, o hidrólisis de inositol fosfolípido. Alternativamente, el polipéptido o fragmento empleado en tal prueba está, bien sea libre en solución, fijado a un soporte sólido, adherido a una superficie celular o localizado intracelularmente. Un método de selección de fármacos utiliza células huésped eucariotas o procariotas que se transforman de manera estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido o fragmento. Los fármacos se seleccionan contra tales células transformadas en ensayos de enlazamiento competitivo. Tales células, bien sea en forma viable o fijada, se utilizan para ensayos de enlazamiento estándar.

Se mide, por ejemplo, la formación de complejos entre AdipoR2 y el agente que está siendo probado. Alternativamente, se examina la disminución en la formación de complejo entre AdipoR2 y un ligando causada por el agente que está siendo probado.

Así, los presentes métodos selección pueden identificar candidatos para fármacos, o cualquier otro agente que afecta la transducción de señales. Estos métodos, bien conocidos en la técnica, comprenden poner en contacto tal agente con polipéptido de AdipoR2 o un fragmento del mismo y ensayar (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido de AdipoR2 o fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre polipéptido de AdipoR2 o un fragmento y la célula. En tales ensayos de enlazamiento competitivo, el polipéptido de AdipoR2 o los fragmentos se marcan típicamente. Después de una incubación adecuada, el polipéptido de AdipoR2 o el fragmento se separa del que está presente en forma enlazada, y la cantidad de marcador libre o no complejo es una medida de la capacidad del agente particular para enlazarse al AdipoR2 o para interferir con el complejo AdipoR2-agente.

Otra técnica para la selección de fármacos proporciona selección de alto rendimiento para compuestos que tienen afinidad de enlazamiento adecuada a polipéptidos de AdipoR2. Dicho en resumen, grandes números de diferentes pequeños compuestos de prueba de péptidos se sintetizan sobre un sustrato sólido, tal como pasadores de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de prueba peptídicos se hacen reaccionar con el polipéptido de AdipoR2 y se lavan. El polipéptido enlazado a AdipoR2 se detecta entonces por métodos bien conocidos en el arte. La AdipoR2 purificada también se recubre directamente sobre placas para utilizar en las técnicas antes mencionadas de selección de fármacos. Además, se utilizan anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

También se describen ensayos de selección de fármacos competitivos en los cuales anticuerpos neutralizantes capaces de enlazarse al AdipoR2 compiten específicamente con un compuesto de prueba por el enlazamiento a los polipéptidos de AdipoR2 o fragmentos de los mismos. De esta forma, se usan anticuerpos para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con el AdipoR2.

**Ejemplo 11: Diseño racional de fármacos (no hace parte de la invención reivindicada):**

La meta del diseño de fármacos racional es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés o de moléculas pequeñas con las cuales ellos interactúan, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se utiliza para conformar fármacos que sean más activos o formas estables del polipéptido o que potencien o interfieran con la función de un polipéptido in vivo.

En una metodología, la estructura tridimensional de una proteína de interés, o un complejo proteína-inhibidor, se determina por cristalografía de rayos X, por modelación por ordenador o, más típicamente, por una combinación de las dos metodologías. Tanto la forma como las cargas del polipéptido deben establecerse para dilucidar la estructura y para determinar los sitios activos de la molécula. Menos frecuentemente, la información útil con respecto a la estructura del polipéptido se obtiene modelando con base en la estructura de las proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural relevante se utiliza para diseñar inhibidores eficientes. Ejemplos útiles de diseño racional de fármacos incluyen moléculas que tengan actividad o estabilidad mejorada o que puedan actuar como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos.

También es posible aislar un anticuerpo específico para el objetivo, seleccionado por un ensayo funcional, tal como se describió anteriormente, y luego para resolver su estructura cristalina. Esta metodología, en principio, produce un farmanúcleo sobre el cual se basa el subsecuente diseño del fármaco. Es posible evitar la cristalografía de proteína completa generando anticuerpos anti-idiotípicos (anti-IDS) para un anticuerpo farmacológicamente activo funcional.

Como una imagen especular de una imagen de un espejo, se espera que el sitio de enlazamiento del anti-IDS sea un análogo del receptor original. El anti-ids se utiliza entonces para identificar y aislar péptidos a partir de bancos de péptidos producidos químicamente o biológicamente. Los péptidos aislados actúan entonces como farmanúcleo.

- 5 En virtud de los métodos descritos aquí, se hace una suficiente cantidad de polipéptido disponible para llevar a cabo tales estudios analíticos tales como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de AdipoR2 provista aquí proporciona guía para aquellos que empleen técnicas de modelación por ordenador en lugar de o además de la cristalografía de rayos X.

**Ejemplo 12: Identificación de otros miembros del complejo de señal de transducción (no hace parte de la invención reivindicada)**

- 10 La AdipoR2 purificada de la invención es una herramienta de investigación para la identificación, caracterización y purificación de proteínas G interactuantes o de otras rutas de transducción de señales. Los marcadores radiactivos se incorporan en un dominio de AdipoR2 seleccionado por diversos métodos conocidos en el arte y se utilizan in vitro para capturar las moléculas interactuantes. Un método preferido involucra la marcación de los grupos amino primarios en AdipoR2 con <sup>125</sup>I con reactivo de Bolton-Hunter. Este reactivo ha sido utilizado para marcar diversas moléculas sin pérdida concomitante de su actividad biológica.

- 15 La AdipoR2 marcada es útil como reactivo para la purificación de moléculas con las cuales interactúa. En una realización de purificación por afinidad, la AdipoR2 enlazada a membranas se acopla por vía covalente a una columna de cromatografía. El extracto libre de células derivado a partir de células sinoviales o de células objetivo putativas se pasa a través de la columna, y las moléculas con afinidad apropiada se enlazan al AdipoR2. El complejo AdipoR2 se recupera de la columna, y el ligando que se enlaza a AdipoR2 se disocia y se somete a un secuenciamiento de proteínas N-terminal. La información de la secuencia de aminoácidos se utiliza entonces para identificar la molécula capturada o para diseñar sondas degenerados de oligonucleótidos para clonar el gen relevante a partir de una biblioteca de ADNc apropiada.

- 20 En un método alternativo, se obtienen anticuerpos contra AdipoR2, específicamente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales son seleccionados para identificar aquellos que inhiben el enlazamiento de la AdipoR2 marcado. Estos anticuerpos monoclonales se utilizan entonces terapéuticamente.

**Ejemplo 13: Uso y administración de anticuerpos, inhibidores o antagonistas (no hace parte de la invención reivindicada):**

- 30 Los anticuerpos, inhibidores o antagonistas de AdipoR2 u otros tratamientos y compuestos que son limitantes de la transducción de señales (LST), proveen efectos diferentes cuando se administran terapéuticamente. Los LST se formulan en un medio de un vehículo acuoso no tóxico, inerte, farmacéuticamente aceptable, preferiblemente a un pH de aproximadamente 5 a 8, más preferiblemente 6 a 8, aunque el pH puede variar de acuerdo con las características del anticuerpo, inhibidor o antagonista que está siendo formulado y la condición que se va a tratar. Las características del LST incluyen solubilidad de la molécula, su vida media y su antigenicidad/inmunogenicidad.
- 35 Estas y otras características ayudan a definir un vehículo efectivo. Las proteínas humanas nativas son preferidas como LST, pero las moléculas orgánicas o sintéticas resultantes de selecciones de fármacos igualmente son efectivas en situaciones particulares.

- 40 Los LST se administran por rutas conocidas de administración incluyendo pero no limitándose a cremas y geles tópicos; aspersiones y aerosoles transmucosa; parches y vendajes transdérmicos; formulaciones inyectables, intravenosas y para lavado; y líquidos y píldoras administradas oralmente formulados particularmente para resistir el ácido y enzimas del estómago. La formulación particular, dosificación exacta y ruta de administración se determina por parte del médico a cargo y varía de acuerdo con cada situación específica.

- 45 Tales determinaciones se hacen considerando variables múltiples tales como la condición que se va a tratar, el LST que se va a administrar, y el perfil farmacocinético de un LST particular. Factores adicionales que se tienen en cuenta incluyen la severidad del estado de la enfermedad, la edad, peso, género y dieta del paciente, tiempo y frecuencia de la administración del LST, combinación posible con otros fármacos, sensibilidades a reacciones, y tolerancia/respuesta a la terapia. Las formulaciones de LST de acción prolongada podrían ser administradas cada 3 o 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la vida media y de la velocidad de eliminación del LST particular.

- 50 Las cantidades de dosificación normales varían de 0.1 a 10<sup>5</sup> µg, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la ruta de administración. En la literatura se provee guía en cuanto a las dosificaciones y métodos particulares de administración; véase las Patente de los Estados Unidos Nos. 4,657,760; 5,206,344; o 5,225,212. Los experimentados en la técnica emplean diferentes formulaciones para diferentes LST. La administración a células tales como células nerviosas requieren la administración de una manera diferente que la de otras células tales como células endoteliales vasculares.
- 55

Se contempla que la transducción de señales anormales, trauma o enfermedades que disparen la actividad de AdipoR2 son tratables con LST. Estas condiciones o enfermedades se diagnostican específicamente mediante pruebas discutidas anteriormente y tales pruebas deben ejecutarse en casos en los que se sospecha de infecciones virales, bacterianas o fúngicas, respuestas alérgicas, lesiones mecánicas asociada con trauma, enfermedades hereditarias, linfoma o carcinoma, u otras condiciones que activan los genes de los tejidos linfoides o neuronales.

**Ejemplo 14: Producción de animales transgénicos no humanos (no hace parte de la invención reivindicada):**

Los sistemas de modelos animales que elucidan los papeles fisiológicos y comportacionales de la AdipoR2 se producen creando animales transgénicos no humanos en los cuales la actividad de la AdipoR2 bien se incrementa o disminuye, o la secuencia de aminoácidos de la AdipoR2 expresada se altera, mediante una variedad de técnicas. Ejemplos de estas técnicas incluyen, pero no se limitan a: 1) Inserción de versiones normales o mutantes de ADN que codifican una AdipoR2, por microinyección, electroporación, transfección retroviral u otros medios bien conocidos para los experimentados en el arte, en embriones apropiadamente fertilizados con el fin de producir un animal transgénico o 2) Recombinación homóloga de versiones mutantes o normales, humanas o animales de estos genes con los locus en los genes nativos en animales transgénicos para alterar la regulación de la expresión o la estructura de estas secuencias de AdipoR2. La técnica de la recombinación homóloga es bien conocida en el arte. Reemplaza el gen nativo con el gen insertado y por lo tanto es útil para producir un animal que no puede expresar la AdipoR2 nativa, pero expresa, por ejemplo, una AdipoR2 mutante insertada, la cual ha reemplazado a la AdipoR2 nativo en el genoma del animal por recombinación, dando como resultando una subexpresión del transportador. La microinyección agrega genes al genoma, pero no los retira, y la técnica es útil para producir un animal que exprese su AdipoR2 propio y el agregado, dando como resultado una sobreexpresión de la AdipoR2.

Un medio disponible para producir un animal transgénico, con un ratón como ejemplo, es como sigue: Se aparean ratones hembra y los ovarios resultantes fertilizados son extraídos de sus oviductos. Los huevos son almacenados en un medio apropiado tal como medio cloruro de cesio M2. Se purifica ADN o ADNc que codifica AdipoR2 a partir de un vector por medios bien conocidos para una persona experimentada en la técnica. Los promotores inducibles pueden ser fusionados con la región codificadora del ADN para proveer un medio experimental para regular la expresión del transgén. Alternativamente o además, pueden fusionarse elementos reguladores específicos para tejidos con la región codificadora para permitir una expresión específica en el tejido del transgén. El ADN, en una solución apropiadamente regulada, se coloca en una aguja de microinyección (la cual puede ser hecha de una tubuladora capilar utilizando un halador de tubo) y el huevo que se va a inyectar es colocado en la lámina de depresión. La aguja es insertada en el pronúcleo del huevo, y se inyecta la solución de ADN. El huevo inyectado es transferido entonces al oviducto de un ratón hembra pseudoembarazada, que es un ratón estimulado por las hormonas apropiadas con el fin de mantener un embarazo falso, de donde se dirige al útero, se implanta y se desarrolla hasta el final. Tal como se anotó anteriormente, la microinyección no es el único método para insertar ADN en el huevo pero se utiliza aquí para propósitos de ejemplo.

35 Listado de secuencias

<110> Bayer AG, BHC

<120> Diagnóstica y terapéutica para enfermedades asociadas con el receptor acoplado de proteína G ADIPOR2 (ADIPOR2)

<130> Le A 36 902

40 <160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3500

<212> ADN

45 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 386 440 T3

agaatttggt	tgtaaggat	gggaaggteg	gtggcgagt	atccctcatg	atgtactacc	60
agactggctc	aaggataatg	acttctcttt	gcatggacac	cggcctccta	tgcttctttt	120
ccgggcctgt	tttaagagca	ttttcagaat	acacacagaa	acaggcaaca	tttggacaca	180
tctcttaggt	tgtgtatcct	tctgtgctt	gggatcctt	tatatgtttc	gccccaaat	240
ctcctttgtg	gccccctgc	aagagaagg	ggtctttgga	ttatTTTTct	taggagccat	300
tctctgcctt	tcttttcat	ggctctcca	cacagtctac	tgccactcag	aggggtctc	360
tcggctcttc	tctaaactgg	attactctgg	tattgctctt	ctgattatgg	gaagttttgt	420
tcttggctt	tattattctt	tctactgtaa	tccacaacct	tgcttcatct	acttgattgt	480
catctgtgtg	ctgggcattg	cagccattat	agtctcccag	tgggacatgt	ttgccacccc	540
tcagtatcgg	ggagtaagag	caggagtgtt	tttgggccta	ggcctgagt	gaatcattcc	600
taccttgcac	tatgtcatct	cggaggggtt	ccttaaggcc	gccaccatag	ggcagatagg	660
ctggttgatg	ctgatggcca	gcctctacat	cacaggagct	gccctgtatg	ctgcccggat	720
ccccgaacgc	tttttccctg	gcaaatgtga	catctggttt	cactctcatc	agctgtttca	780
tatctttgtg	gttctggag	ctttgttca	cttccatggt	gtctcaaacc	tccaggagtt	840
tcgtttcatg	atcggcgggg	gctgcagtga	agaggatgca	ctgtgatacc	taccagtctc	900
cagggactat	gaccctaaac	cagggcctgc	ggcacttgcg	ggcctccctg	ctggctactg	960
atgccagtac	cagaggagcc	ccaaaacttt	gacagcctcg	tgggctttgt	gacggcccag	1020
gggctctgcg	tggtacatga	ctgagaagag	aaaaacaaaa	ataaatcata	cctcaaagga	1080
tggagtgcac	caattgggag	aaaaggagac	atagcccaaa	ccctggetta	ttcttgggat	1140
ctactgattg	cgggctctgc	aagacccttg	gcaaactggc	ttctgatcca	tatcatattt	1200
attttagaaa	gatggcgaaa	cagtttagct	ggtggttctt	tcttctccct	ttctctctct	1260
ctatgacaat	aatacaaac	aatttaagt	aacatttata	tccgataagg	ggtgggagt	1320
tgattttaaa	tgctcttttg	ggagaacaaa	gaaattaatg	taaataagat	ttctaactgt	1380

ES 2 386 440 T3

```

ttaaataaga ctttatataa atgtttaaaa cataggggta agggagggag ggagaatfff 1440
tgtatagaat gaaacatgca agtaccacac actgtttgaa ttttgcaaaa aaagtgactg 1500
taggatcagg tgatagcccc ggaatgtaca gtgtcttggg gcaccaagat gccttctaaa 1560
ggctgacata ccttggaccc taatggggca gagagtatag ccctagccca gtggtgacat 1620
gaccactccc tttgggaggg ctgaggtaga ggggagtggt atgtgttttc tcagtggag 1680
cagcacatga gtgggtgaca ggatgttaga taaaggctct agttaggggtg tcattgtcat 1740
ttgagagact gacacactcc tagcagctgg taaaggggtg ctggaggcca tggaggagct 1800
ctagaaacat tagcatgggc tgatctgatt acttctctggc atcccgcaca cctttatggg 1860
aagtcttatt agagggatgg gacagttttc catatccttg ctgtggagct ctggaacact 1920
ctctaaatff cctctatta aaaactactg ccctaactat acttctctct tgagggata 1980
gaaatggacc tttctctgac atagttcttg gcattgggagc cagccacaaa tgagattctg 2040
acgtgtccag gtttctctct agctcatcta catagattgg tagacccttc ctttggatta 2100
ggaaagatga gttttacctc tggtagactg tcttggtaag cctggatgtg acagacacct 2160
cggctctctc tgaataagaa agccagcaga actcttaaag ceagttgtag taeggagtgg 2220
tcagcactca ctgaacctca ctttacaggg ataagagtgg tgtggcattt taaatacaat 2280
ggtatgttat tgccagggag tgaggtacaa gacgatggct catgtcacag gctacctga 2340
tacgggtgtc gagaaagtgg tggggaaagg atctgtttca tggaaattctg atcttggccc 2400
ataggtgaac caccaaaata gtgctcgagt cttaggttac tgtcatcaaa gacttgggat 2460
gactecatta tatctggggg ttgtgggtat tagaactaaa tatggaggtc ctgagcatgg 2520
ggactgggtg cctcagtagg tgtttgggaa tatgggaagg gtctctatt tattcaatag 2580
agttttctca gttattttcc tccctegccc ttgcaatctc cagcaaaagg tgggatctag 2640
gaagaaagaa tccagtgtag aagttgagaa gaacttgaac gttttgggtc tggataaggt 2700
cactgtccta ggtgctaggt ggaccgagca aaagactcag tggatgaact ggtgcagtgc 2760
ctgacagaat aaagaacagt attaatccct ttgagaaaagc atagtccagc aggacagtgg 2820
ccatttggac agaagccca cttagtttctt gggagcaaca gcacgtatca gaagccagac 2880
ttgtctctcg gtcattgca cttgggataca gcgtataggt gcagccctgt cacaacacca 2940
acagaagtag cagcctctgg gtgcagtcac ccacacccca aagctggaag gatctgggtc 3000
aacatagcac aaacccttag gaaaaatgaa attaacatca ctgatgtgta atccagtaaa 3060
atctcccttt ttcgggtgtg tatgtgggca tgtgcccatt tctatgtgtg tgtctacgtg 3120
cagctcacta ccaacagcct catgtgca cttgacctgaca gtgctcgctg agaactctca 3180
ccaggttggc gcctgaaatgc cttactctca gcagtcagag gcttgettgc tetgtgcaga 3240
ttttaatfff tcttttttgg ccctaggtctg gttgggacct ctacagcttc attctttcac 3300
attaaatagt gacctttttc agtattttcc ctcttccctt ttataaatta tgctaaagcc 3360
acaaagcaca tttttgggga tcatagaagg ttgggggtcc agaaaggeat ctgtgtgatg 3420
gttcattga tgtgggattt ccctacttgc tgtattctca gtttctaata aaaagaacca 3480
aatgaaaaaa aaaaaaaaaa 3500

```

<210> 2

<211> 258

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Pro Ser Phe Arg Ala Cys Phe Lys Ser Ile Phe Arg Ile His Thr
1           5           10           15
Glu Thr Gly Asn Ile Trp Thr His Leu Leu Gly Cys Val Ser Phe Leu
           20           25           30
Cys Leu Gly Ile Phe Tyr Met Phe Arg Pro Asn Ile Ser Phe Val Ala
           35           40           45
Pro Leu Gln Glu Lys Val Val Phe Gly Leu Phe Phe Leu Gly Ala Ile
           50           55           60
Leu Cys Leu Ser Phe Ser Trp Leu Phe His Thr Val Tyr Cys His Ser
65           70           75           80
Glu Gly Val Ser Arg Leu Phe Ser Lys Leu Asp Tyr Ser Gly Ile Ala
           85           90           95
Leu Leu Ile Met Gly Ser Phe Val Pro Trp Leu Tyr Tyr Ser Phe Tyr
           100          105          110
Cys Asn Pro Gln Pro Cys Phe Ile Tyr Leu Ile Val Ile Cys Val Leu
           115          120          125
Gly Ile Ala Ala Ile Ile Val Ser Gln Trp Asp Met Phe Ala Thr Pro
           130          135          140
Gln Tyr Arg Gly Val Arg Ala Gly Val Phe Leu Gly Leu Gly Leu Ser
145          150          155          160
Gly Ile Ile Pro Thr Leu His Tyr Val Ile Ser Glu Gly Phe Leu Lys
           165          170          175
Ala Ala Thr Ile Gly Gln Ile Gly Trp Leu Met Leu Met Ala Ser Leu
           180          185          190
Tyr Ile Thr Gly Ala Ala Leu Tyr Ala Ala Arg Ile Pro Glu Arg Phe
           195          200          205
Phe Pro Gly Lys Cys Asp Ile Trp Phe His Ser His Gln Leu Phe His
           210          215          220
Ile Phe Val Val Ala Gly Ala Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn
225          230          235          240

Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp
           245          250          255
Ala Leu

```

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador de avance

<400> 3

catggtgtct caaacctcca 20

10 <210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador inverso

<400> 4

cagtgcaccc tcttcactgc 20

<210> 5

<211> 23

10 <212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sonda

<400> 5

15 agtttcgttt catgatcggc ggg 23

Referencias

U.S. 4,522,811

U.S. 5,283,317

U.S. 5,565,332

20 WO 84/03564

WO 92/01810

WO 93/03151

WO 94/13804

WO 01/04297

25 WO 01/57190

WO 01/90304

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ; Nucleic Acids Res 1997 Sep 1; 25 (17): 3389-402

Appa Rao et al., 1997, Protein Expr Purif Nov, 11 (2): 201-8

30 Barnes, 2000, Chest, 117:10S14S

Botstein et al., 1980, Am J Hum Genet. 32: 314-31

Colbere-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150, 1-14

Engelhard et al., 1994, Proc. Nat. Acad. Sci. 91, 3224-3227

Gergen and Weiss , 1992, Am Rev Respir Dis 146:823-824

35 Gibson et al., 1996, Genome Research 6: 995-1001

Haseloff et al., 1988 , Nature 334, 585-591

- Heid et al., 1996, *Genome Research* 6: 986-994
- Holland et al., 1991, *PNAS* 88: 7276-7280
- Iwabuchi et al., 1993, *Oncogene* 8, 1693-1696
- Jeffreys et al., 1985, *Nature* 316: 76-9
- 5 Johnson et al., 1989, *Endoc. Rev.* 10, 317-331
- Kellogg et al., 1990, *Anal. Biochem.* 189:202-208
- Lam , 1997, *Anticancer Drug Res.* 12(3):145-67
- Lefkowitz, 1991, *Nature* 351, 353-354
- Livak et al., 1995 , *PCR Methods and Applications* 357-362
- 10 Logan, Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659
- Lowy et al., 1980, *Cell* 22, 817-23
- Maddox et al., 1983, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216
- McConnell et al. , 1992 , *Science* 257, 1906-1912
- Nicholls et al., 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91
- 15 Piatak et al., 1993, *BioTechniques* 14:70-81
- Piatak et al., 1993, *Science* 259:1749-1754
- Porath et al., 1992, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281
- Roberge et al., 1995, *Science* 269, 202-204
- Sjolander, Urbaniczky, 1991, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345
- 20 Szabo et al., 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705
- Thomas, 1980, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77:5201-5205
- Uhlmann et al., 1987, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542
- Weber et al., 1990, *Genomics* 7: 524-30
- Wigler et al., 1977, *Cell* 11, 223-32
- 25 Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70
- Yamauchi et al., (2003), *Nature* 423: 762-769

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para diagnosticar una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades consistente de cáncer, en un mamífero que comprende las etapas de
- 5 i) determinar la cantidad de un polinucleótido de AdipoR2 en una muestra tomada de dicho mamífero,
- ii) determinar la cantidad de polinucleótido de AdipoR2 en mamíferos saludables y/o enfermos.

Fig. 1

SEQ ID NO: 1

AGAATTTGTTTGTAAGGTATGGGAAGGTCGGTGGCGAGTGATCCCTCA  
 TGATGTACTACCAGACTGGCTCAAGGATAATGACTTCCTCTTGATGG  
 ACACCGGCCTCCTATGCCTTCTTCCGGGCCTGTTTTAAGAGCATTTT  
 CAGAATACACACAGAAACAGGCAACATTTGGACACATCTCTTAGGTTG  
 TGTATCCTTCCTGTGCCTGGGGATCTTTTATATGTTTCGCCCAAATAT  
 CTCCTTTGTGGCCCCTCTGCAAGAGAAGGTGGTCTTTGGATTATTTTT  
 CTTAGGAGCCATTCTCTGCCTTTCTTTTTTCATGGCTCTTCCACACAGT  
 CTACTGCCACTCAGAGGGGGTCTCTCGGCTCTTCTCTAAACTGGATTA  
 CTCTGGTATTGCTCTTCTGATTATGGGAAGTTTTGTTCCCTTGCTTTA  
 TTATTCTTTCTACTGTAATCCACAACCTTGCTTCATCTACTTGATTGT  
 CATCTGTGTGCTGGGCATTGCAGCCATTATAGTCTCCCAGTGGGACAT  
 GTTTGCCACCCCTCAGTATCGGGGAGTAAGAGCAGGAGTGTTTTTGGG  
 CCTAGGCCTGAGTGGAATCATTCCTACCTTGCACTATGTCATCTCGGA  
 GGGGTTCCCTTAAGGCCGCCACCATAGGGCAGATAGGCTGGTTGATGCT  
 GATGGCCAGCCTCTACATCACAGGAGCTGCCCTGTATGCTGCCCGGAT  
 CCCCGAACGCTTTTTTCCCTGGCAAATGTGACATCTGGTTTTCACTCTCA  
 TCAGCTGTTTTCATATCTTTGTGGTTGCTGGAGCTTTTTGTTCACTTCCA  
 TGGTGTCTCAAACCTCCAGGAGTTTCGTTTTCATGATCGGCGGGGGCTG  
 CAGTGAAGAGGATGCACTGTGATACCTACCAGTCTCCAGGGACTATGA  
 CCCTAAACCAGGGCCTGCGGCCTTGCGGGCCTCCCTGCTGGCTACTG  
 ATGCCAGTACCAGAGGAGCCCCAAAACCTTTGACAGCCTCGTGGGCTTT  
 GTGACGGCCCAGGGGCTCTGCGTGGTACATGACTGAGAAGAGAAAAAC  
 AAAAATAAATCATACTCAAAGGATGGAGTGCATCAATTGGGAGAAAA  
 GGAGACATAGCCCAAACCCTGGCTTATTCTTGGGATCTACTGATTGCG  
 GGCTCTGCAAGACCCTTGGCAAACCTGGCTTCTGATCCATATCATATTT  
 ATTTGTAGAAGATGGCGAAACAGTTTAGCTGGTGGTTCTTTCTTCTCC  
 CTTTCTCTCTCTATGACAATAATACAAACCAATTTAAGTGAACATT  
 TATATCCGATAAGGGGTGGGAGTGTGATTTTAAATGCTCTTTTGGGAG  
 AACAAAGAAATTAATGTAAATAAGATTTCTAACTGTTTAAATAAGACT  
 TTATATAAATGTTTAAAACATAGGGGTAAAGGGAGGGGAGAATTTT  
 TGTATAGAATGAAACATGCAAGTACCACACACTGTTTGAATTTTGCAC  
 AAAAAGTGACTGTAGGATCAGGTGATAGCCCCGGAATGTACAGTGTCT  
 TGGTGCACCAAGATGCCTTCTAAAGGCTGACATACCTTGGACCCTAAT  
 GGGGCAGAGAGTATAGCCCTAGCCAGTGGTGACATGACCACTCCCTT  
 TGGGAGGCCTGAGGTAGAGGGGAGTGGTATGTGTTTTCTCAGTGGAAG  
 CAGCACATGAGTGGGTGACAGGATGTTAGATAAAGGCTCTAGTTAGGG  
 TGTCATTGTCAATTTGAGAGACTGACACACTCCTAGCAGCTGGTAAAGG  
 GGTGCTGGAGGCCATGGAGGAGCTCTAGAAACATTAGCATGGGCTGAT  
 CTGATTACTTCCTGGCATCCCGCTCACCTTTATGGGAAGTCTTATTAG  
 AGGGATGGGACAGTTTTCCATATCCTTGCTGTGGAGCTCTGGAACACT

Fig. 1 (continuación)

CTCTAAATTTCCCTCTATTAAAAATCACTGCCCTAACTATACTTCCTC  
 CTTGAGGGAATAGAAATGGACCTTTCTCTGACATAGTTCTTGGCATGG  
 GAGCCAGCCACAAATGAGATTCTGACGTGTCCAGGTTTCTCCTGAGCT  
 CATCTACATAGATTGGTAGACCCTTCCTTTGGATTAGGAAAGATGAGT  
 TTTACCTCTGGTACACTGTCTTGGTAAGCCTGGATGTGACAGACACCT  
 CGGCTCTCCTTGAATAAGAAAGCCAGCAGAACTCTTAAAGCCAGTTGT  
 AGTACGGAGTTGTCAGCACTCACTGAACCTCACTTTACAGGGATAAGA  
 GTGGTGTGGCATTTTTAAATACAATGGTATGTTATTGCCAGGGAGTGAG  
 GTACAAGACGATGGCTCATGTACAGGCCTACCTGATACGGTGTGAGA  
 GAAAGTGGTGGGGAAAGGATCTGGTTCATGGAATTCTGATCTTGGCCC  
 ATAGGTGAACCACCAAATAGTGCTCGAGTCTTAGGTTACTGTCATCA  
 AAGACTTGGGATGACTCCATTATATCCTGGGGTTGTGGGTATTAGAAC  
 TAAATATGGAGGTCCTGAGCATGGGGACTGGTGTCCCTCAGTAGGTGTT  
 TGGGAATATGGGAAGGGTCTCCTATTTATTCAATAGAGTTTTCTCAGT  
 TATTTTCCCTCCCTCGCCCTTGCAATCTCCAGCAAAGGTGGGATCTAG  
 GAAGAAAGAATCCAGTGTAGAAGTTGAGAAGAAGTGAACGTTTTGGT  
 TCTGGATAAGGTCACTGTCCTAGGTGCTAGGTGGACCGAGCAAAGAC  
 TCAGTGGATGAACTGGTGCAGTGCCTGACAGAATAAAGAACAGTATTA  
 ATCCCTTTGAGAAAGCATAGTCCAGCAGGACAGTGGCCATTTGGACAG  
 AAGCCCCTTAGTTTTCTTGGGAGCAACAGCACGTATCAGAAGCCAGAC  
 TTGCTCTTCGGTCATGCACTTTGGGATACAGCGTATAGGTGCAGCCCT  
 GTCACAACACCAACAGAAGTAGCAGCCTCTGGGTGCAGTCACCCACAC  
 CCCAAAGCTGGAAGGATCTGGTTCAACATAGCACAAACCCTTAGGAAA  
 AATGAAATTAACATCACTGATGTGTAATCCAGTAAAATCTCCCTTTTT  
 CGGGTGTGTATGTGGGCATGTGCCCATTTCTATGTGTGTGTCTACGTG  
 CAGCTCACTACCAACAGCCTCATGTGCACTTGACCTGACAGTGCTCGC  
 TGAGAACTCTCACCAGGTTGGCGCCTGAATGCCTTACTCTCAGCAGTC  
 AGAGGCTTGCTTGCTCTGTGCAGATTTTTAATTTTCTTTTTTGGCCCT  
 AGGCTGGTGGGACCTCTACAGCTTCATTCTTTCACATTAATAGTGA  
 CCTTTTTTCAGTATTTTCCCTCTTCCCCTTTATAAATTATGCTAAAGCC  
 ACAAAGCACATTTTTGGGGATCATAGAAGGTTGGGGTTCCAGAAAGGC  
 ATCTGTGTGATGGTTCCATTGATGTGGGATTTCCCTACTTGCTGTATT  
 CTCAGTTTCTAATAAAAAGAACCAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Fig. 2**

**SEQ ID NO: 2**

MPSFRACFKSIFRIHTETGNIWTHLLGCVSFLCLGIFYMFRPNISFVA  
PLQEKVVFGFLFFLGAILCLSFSWLFHTVYCHSEGVSRLFSKLDYSGIA  
LLIMGSFVPWLYYSFYCNPQPCFIYLIVICVLGIAAIIVSQWDMFATP  
QYRGVRAGVFLGLGLSGIIPTLHYVISEGFLKAATIGQIGWLMLMASL  
YITGAALYAARI PERFFPGKCDIWFHSHQLFHI FVVAGAFVHFHGVSN  
LQEFRFMIGGGCSEEDAL

**Fig. 3**

**SEQ ID NO: 3**

5' -CATGGTGTCTCAAACCTCCA -3'

**Fig. 4**

**SEQ ID NO: 4**

5' -CAGTGCATCCTCTTCACTGC -3'

**Fig. 5**

**SEQ ID NO: 5**

5' -AGTTTCGTTTCATGATCGGCGGG -3'