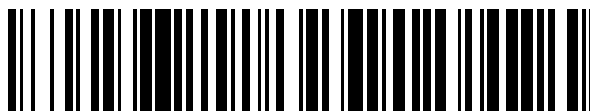


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 451**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2006** **E 06850865 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014** **EP 1954312**

54 Título: **Detección de péptidos solubles del receptor de adiponectina y uso en diagnóstico y en terapéutica**

30 Prioridad:

07.12.2005 US 748305 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2014

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 BENEDICT AVENUE
TARRYTOWN, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

PUGIA, MICHAEL J.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 463 451 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

Detección de péptidos solubles del receptor de adiponectina y uso en diagnóstico y en terapéutica.

Referencia cruzada con la solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica los beneficios de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/748.305 presentada el 7 de diciembre de 2005.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a fragmentos solubles del terminal C del receptor de adiponectina y su uso en el diagnóstico y tratamiento de trastornos.

Antecedentes de la invención

10 La obesidad con inflamación crónica tiene una población grande y creciente. Esta población tiene claramente un alto riesgo cardiovascular y de diabetes, y con frecuencia se desarrolla el síndrome metabólico con resistencia a la insulina. Recientemente se han descubierto la adiponectina y otras adipoquinas como hormonas de células grasas que controlan el metabolismo de la glucosa. Tanto el tipo y como la ubicación de las células grasas son importantes. La obesidad produce adipocitos adicionales que secretan adiponectina en la sangre ayudando al metabolismo de las
15 células del músculo de grasas y glucosa. Algunos pacientes con sobrepeso se vuelven resistentes a la insulina. En este caso, los adipocitos dejan de producir adiponectina. Los niveles de adiponectina en la sangre se reducen en condiciones de obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Existen métodos para la medición de los niveles de adiponectina en los sujetos para el pronóstico de estos y otros estados de enfermedad. La medición de los niveles de adiponectina, sin embargo, ha demostrado ser un indicador débil de la enfermedad. Existe la necesidad de mejores métodos para controlar los estados de enfermedad asociados con la actividad anormal de los adipocitos.
20 La presente invención satisface esta y otras necesidades.

Resumen

25 Los presentes inventores han descubierto, que fragmentos del terminal C del receptor de adiponectina son solubles y pueden ser detectados en los fluidos corporales. La presente invención proporciona el método de la reivindicación 1.

Los métodos para la detección de la fragmentación de un receptor de adiponectina en una muestra de fluido biológico obtenida de un sujeto puede comprender las etapas de analizar la presencia o ausencia de al menos un fragmento soluble del terminal C del receptor de adiponectina. En ciertas formas de realización, se determina la concentración total de fragmentos del terminal C en una muestra biológica.

30 Los métodos para la detección del nivel de expresión de un receptor de adiponectina en un sujeto se divulgan en la presente invención. Estos métodos pueden comprender las etapas de determinar el nivel de al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina en una muestra de fluido biológico y correlacionar el nivel del fragmento del terminal C con el nivel de expresión del receptor de adiponectina. En ciertas formas de realización, se determina la concentración total de fragmentos del terminal C en una muestra biológica.

35 Los métodos para detectar el nivel de expresión de adiponectina en un sujeto se divulgan en la presente invención. Estos métodos pueden comprender las etapas de determinar el nivel de al menos un fragmento de terminal C del receptor de adiponectina en una muestra de fluido biológico y correlacionar el nivel del fragmento del terminal C con el nivel de expresión de adiponectina. En ciertas formas de realización, se determina la concentración total de fragmentos del terminal C en una muestra biológica.

40 Los métodos para determinar el avance de una condición, el inicio de una condición, es decir, el diagnóstico, o la eficacia del tratamiento, es decir, la sensibilidad de un individuo a la terapia con un fármaco particular, están abarcados por la presente invención. Preferiblemente, la condición estará asociada con patrones de fragmentación anormales de un receptor de adiponectina. Estos métodos pueden comprender las etapas de determinar el nivel de al menos un fragmento de terminal C del receptor de adiponectina en una muestra de fluido biológico y correlacionar el nivel del fragmento de terminal C con el avance de la condición, el inicio de la condición, o eficacia del tratamiento.
45 En ciertas formas de realización, se determina la concentración total de fragmentos del terminal C en una muestra biológica.

50 En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más (es decir, al menos un) fragmento soluble de terminal C del receptor de adiponectina. Por ejemplo, se puede detectar cualquier combinación de fragmentos 1 a 22 de AdipoR1 y/o AdipoR2. En ciertas formas de realización, se pueden detectar los fragmentos 1 a 22 de AdipoR1 y/o

AdipoR2 y diferenciarlos por sus masas. Por lo tanto la presente invención proporciona métodos para la determinación del nivel de fragmentos que tienen, por ejemplo, masas aproximadamente desde 1 kDa hasta aproximadamente 3 kDa, incluyendo, por ejemplo, una masa de aproximadamente 2 kDa (por ejemplo, fragmentos representados por las SEQ ID NOS: 3, 12 - 22, 25, y 34 - 44) o fragmentos que tienen masas desde aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 4,2 kDa, incluyendo por ejemplo una masa de aproximadamente 3,9 kDa (por ejemplo, fragmentos representadas por las SEQ ID NOS: 1, 2, 4 - 11, 23, 24 y 26 - 33). Estos tamaños de fragmentos están típicamente presentes como monómeros. La presente invención también proporciona métodos para determinar el nivel de fragmentos que tienen, por ejemplo, masas de aproximadamente 2 kDa hasta aproximadamente 6 kDa, incluyendo por ejemplo una masa de aproximadamente 4 kDa o masas de aproximadamente 7 kDa hasta aproximadamente 8,4 kDa, incluyendo, por ejemplo, una masa de aproximadamente 7,8 kDa. Estos tamaños de fragmentos están típicamente presentes como dímeros.

En los métodos de la presente invención, uno o más fragmentos solubles de terminal C del receptor de adiponectina (por ejemplo, las SEQ ID NOS: 1 - 44) pueden ser detectados cuando se enlazan a una proteína portadora. Por ejemplo, se puede detectar cualquier combinación de fragmentos de 1 a 22 de AdipoR1 y / o AdipoR2 cuando se une a una proteína portadora. Por consiguiente, en ciertas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para determinar el nivel de fragmentos que tienen masas de aproximadamente 4.5 - 6.9, 7 - 8.2, 9 - 11, 13 - 15, 17 - 19, 27 - 29, o 30 - 34 kDa. En ciertas formas de realización, la proteína portadora es adiponectina, incluyendo fragmentos de adiponectina. En ciertas formas de realización, el receptor de adiponectina combinado con adiponectina enlazada tiene una masa de aproximadamente 3 - 5, 4 - 8, 7 - 11, 13 - 17, 22 - 26 o 28 - 32 kDa. La presente invención proporciona métodos de detección de estos fragmentos.

Se divulgan además polipéptidos que son sustancialmente idénticos a fragmentos que tienen las secuencias de las SEQ ID NOS: 1 a 44 y las secuencias de ácidos nucleicos que corresponden a estos fragmentos. También se incluyen anticuerpos que se unen específicamente a al menos uno de los fragmentos del terminal C del receptor de adiponectina proporcionado en la presente invención.

Se divulga además un kit para su uso en la determinación de la estrategia de tratamiento para un individuo con cualquiera de los trastornos descritos en el presente documento que comprende un medio para detectar al menos uno de los fragmentos descritos en el presente documento; y opcionalmente instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit. El kit también puede comprender, por ejemplo, un medio para obtener una muestra biológica de un individuo.

Descripción detallada de formas de realización ilustrativas

I. Introducción

Los presentes inventores han descubierto, que los fragmentos del terminal C del receptor de adiponectina son solubles y se pueden detectar en fluidos corporales. Además, los presentes inventores han observado que la presencia o ausencia de ciertos fragmentos solubles del receptor adiponectina en los fluidos corporales es predictivo de la enfermedad y que el nivel, es decir, la concentración de fragmentos solubles totales del receptor de adiponectina en el fluido corporal es predictivo de la enfermedad.

Se debe entender que la invención descrita en el presente documento no se limita a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología utilizada aquí tiene el propósito de describir formas de realización particulares solamente, y no se pretende que se constituya en limitante. Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una, uno" y "el, la" incluyen los respectivos plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

El término "aproximadamente" como se utiliza aquí para referirse a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos descritos.

II. Receptor de adiponectina y fragmentos del mismo

El receptor de adiponectina es un receptor transmembrana que fue descrito por primera vez por Yamauchi et al., (Nature, 2003, 423 (6941), 762 - 9) y tiene varios tipos. Se han identificado tres tipos de receptores de adiponectina, el receptor 1 de adiponectina (también conocido como AdipoR1), el receptor 2 de adiponectina (también conocido como AdipoR2) y el receptor 3 de adiponectina (también conocido como AdipoR3). Los receptores de adiponectina se unen específicamente a y son modulados por la adiponectina, un factor derivado de adipocito que juega un papel importante en metabolismo de lípidos y de glucosa en el músculo y el hígado.

La secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos de los receptores de adiponectina humana 1 y 2 se encuentran disponibles en bases de datos públicas (por ejemplo, véanse los números de acceso del GenBank NM_015999, AK222503, AK025085, AK222503, NM_024551, Q96A54 y Q86V24) y se proporcionan en este documento. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del receptor 3 de adiponectina humana se suministran en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20050032166. Se entenderá que el término receptor de adiponectina, tal como se utiliza en la presente memoria, no solamente abarca los receptores de adiponectina que tienen las secuencias descritas en el presente documento sino que también incluye, por ejemplo, formas truncadas de origen natural de un receptor de adiponectina, formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas alternativamente empalmadas), variantes modificadas de manera conservadora, y, variantes alélicas de origen natural. El documento US 2005032166 A1 divulga la secuencia de AdipoR2, indica el uso posible del fragmento del terminal C desde el aminoácido 365 hasta el 386 como posible objetivo terapéutico. Este documento sugiere el uso de AdipoR2 y fragmentos para diagnóstico de algunas enfermedades, pero no enseña cómo correlacionar esta determinación con un resultado diagnóstico particular. Como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de adiponectina" abarca tanto AdipoR1 y AdipoR2.

"Variantes modificadas de manera conservadora" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, hasta secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos al aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que se especifica una alanina por un codón, el codón puede ser alterado por cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas en forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico aquí que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Alguien capacitado en el arte reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a secuencias de sonda reales.

Como con las secuencias de aminoácidos, una persona capacitada en la técnica reconocerá que sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína que altera, añade o suprime un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada en forma conservadora" en donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar son bien conocidas en el arte. Tales variantes modificadas en forma conservadora se añaden a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente "variantes de empalme". Del mismo modo, una proteína particular codificada por un ácido nucleico que abarca implícitamente cualquier proteína codificada por una variante de empalme de ese ácido nucleico. "Variantes de empalme" como su nombre lo indica, son productos de empalme alternativos de un gen. Después de la transcripción, un transcripto inicial de ácido nucleico se puede empalmar de manera que diferentes (alternativos) productos de empalme de ácido nucleico codifiquen diferentes polipéptidos. Los mecanismos para la producción de variantes de empalme varían, pero incluyen el empalme alternativo de exones. Los polipéptidos alternativos derivados del mismo ácido nucleico mediante transcripción a través de lectura también están abarcados por esta definición. Cualquiera de los productos de una reacción de empalme, incluyendo formas recombinantes de los productos de empalme, están incluidos en esta definición.

La frase "fragmentos solubles del terminal C del receptor de adiponectina" se refiere a fragmentos de terminal C del receptor de adiponectina que se desprenden del receptor de adiponectina y son solubles en los fluidos corporales. Se pueden utilizar una variedad de fluidos corporales en la práctica de los métodos de la invención incluyendo, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, fluido salivar, fluido ascítico y similares.

La adiponectina es bien conocida en la técnica como una hormona secretada por los adipocitos que tienen propiedades sensibilizadoras de insulina, antiaterogénicas, y antiinflamatorias. Los niveles de adiponectina se reducen bajo ciertas condiciones, incluyendo obesidad, resistencia a la insulina y diabetes. La actividad de la adiponectina es mediada por sus receptores. La adiponectina puede existir como un fragmento de longitud completa

o como un fragmento globular más pequeño. Hay cuatro regiones distintas de adiponectina. La primera es una secuencia de señal corta que dirige la hormona para secreción fuera de la célula, luego está una región corta que varía entre especies; la tercera es una región con similitud con las proteínas de colágeno; y la última es un dominio globular. La masa monomérica predicha para la adiponectina es de 26 kDa con un intervalo de aproximadamente 17 hasta aproximadamente 33 kDa. La formación de oligómero de adiponectina depende de la formación de enlaces disulfuro mediada por un residuo interno de cisteína. La adiponectina existe en una amplia gama de complejos de multímeros en el plasma y se combina a través de su dominio de colágeno para crear 3 formas oligoméricas principales: una forma de bajo, medio y alto peso molecular. Las serina proteasas tales como la elastasa y la tripsina tienen múltiples sitios para la escisión de la adiponectina. Se sabe que se produce una liberación de adiponectina globular con un peso molecular promedio de aproximadamente 16 kDa en los pacientes. El resto de la adiponectina no globular tiene un peso molecular promedio de 10 kDa. La escisión de la adiponectina por una serina proteasa de tipo tripsina puede ocurrir, por ejemplo, en el aminoácido 101 causando una adiponectina globular 16,5 kDa o por una serina proteasa de tipo elastasa en el aminoácido 108 causando una adiponectina globular de 15,8 kDa. Existen múltiples sitios de escisión potenciales en los aminoácidos 88 a 108 que causan un rango de masa para la adiponectina globular aproximadamente entre 17,8 kDa hasta aproximadamente 9,7 kDa. La escisión de proteasa adicional de la adiponectina no globular puede producir fragmentos tan pequeños como de 3 kDa.

Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la cola del terminal C del receptor de adiponectina actúa para capturar la adiponectina de longitud completa. Se cree que ocurre un enlazamiento entre la porción no globular de la proteína adiponectina y el dominio de enlazamiento de la cola de adiponectina del receptor de adiponectina. Después de la escisión por la proteasa, se cree que la adiponectina no globular permanece enlazada a la región del terminal C del receptor de adiponectina. Se cree que la adiponectina globular liberada interactúa con otra región en el receptor para provocar una activación adicional. En ausencia de adiponectina no globular, no se cree que ocurra el enlazamiento con el terminal C.

Los presentes inventores han descubierto que la porción del terminal C del receptor de adiponectina fragmenta al receptor y está presente en fluido corporal. La presencia o el nivel de adiponectina no globular pueden afectar el patrón de fragmentación para el terminal C del receptor de adiponectina. Los presentes inventores han detectado fragmentos del receptor de adiponectina 1 y 2 en el fluido corporal. La observación y la conclusión de que el receptor de adiponectina puede ser detectado en fluido biológico y que proporciona un indicador confiable y práctico de estados de enfermedad es particularmente sorprendente dado el hecho de que el receptor de adiponectina es una proteína integral de membrana. También es sorprendente que ciertos fragmentos tienden a estar ausentes en la enfermedad y que el aumento en el número total o la concentración de fragmentos del receptor se produce en estados de enfermedad, dado que los niveles de adiponectina disminuye con la enfermedad.

La presente invención divulga, entre otros, los fragmentos del receptor de adiponectina 1 al 22 (SEQ ID NOs: 1 - 22) de AdipoR1. El fragmento 1 de AdipoR1 tiene 34 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 361 a 375 en AdipoR1. Los aminoácidos 1 - 14 son el dominio de escisión de la serina proteasa; los aminoácidos 15 - 22 son el dominio tipo adipoR2; y los aminoácidos 23 - 34 son el dominio de enlazamiento de adiponectina. La secuencia del fragmento 1 de AdipoR1 es vivvaaafvh fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 1). Este fragmento puede ser aún más fragmentado en cualquier aminoácido, y, en particular, en cualquier aminoácido dentro del dominio de escisión de la serina proteasa, el dominio tipo adipoR1, o el dominio de enlazamiento de adiponectina. Ciertos fragmentos clave presentes en fluido corporal son el fragmento 2 con una secuencia de lwaaafvh fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 2) y el fragmento 3 con una secuencia de snlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 3) pero al menos se pueden encontrar los siguientes fragmentos: vvaafvh fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 4), vaaafvh fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 5), aaafvh fygvsnlqef ryieggtc dtll (SEQ ID NO: 6), aafvh fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 7), afvh fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 8), fvh fygvsnlqef ryieggtc dtll (SEQ ID NO: 9), vh fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 10), h fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 11), fygvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 12), ygvsnlqef ryieggtc dtll (SEQ ID NO: 13), gvsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 14), vsnlqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 15), nlqef ryieggtc dtll (SEQ ID NO: 16), lqef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 17), qef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 18), ef ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 19), f ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 20), ryleggctd dtll (SEQ ID NO: 21), y yleggctd dtll (SEQ ID NO: 22).

La presente invención divulga, entre otros, los fragmentos del receptor de adiponectina 1 a 22 (SEQ ID NOs: 23 - 44) de AdipoR2. El fragmento 1 de AdipoR2 tiene 34 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 353 a 386 en AdipoR2. Los aminoácidos 1 - 14 son el dominio de escisión de la serina proteasa; los aminoácidos 15 - 22 son el dominio tipo adipoR2; y los aminoácidos 23 - 34 son el dominio de enlazamiento de adiponectina. La secuencia del fragmento 1 de AdipoR2 es ifvagaafvh fhgvsnlqef; los aminoácidos 15 - 22 son el dominio tipo adipoR2; y los aminoácidos 23 - 34 son el dominio de enlazamiento de adiponectina. La secuencia del fragmento 1 de AdipoR2 es ifvagaafvh fhgvsnlqef rfingggcse edal (SEQ ID NO: 23). Este fragmento puede ser fragmentado aún más en cualquier aminoácido, y, en particular, en cualquier aminoácido dentro del dominio de escisión de la serina proteasa, dominio tipo adipoR2, o dominio de enlazamiento de adiponectina. Los fragmentos clave presentes en fluido corporal son el fragmento 2 con una secuencia de vgaafvh fhgvsnlqef rfingggcse edal (SEQ ID NO: 24) y el fragmento 3 con una secuencia de snlqef rfingggcse edal (SEQ ID NO: 25) pero también se pueden encontrar al menos el siguientes fragmentos: fvagaafvh fhgvsnlqef rfingggcse edal (SEQ ID NO: 26), vgaafvh fhgvsnlqef rfingggcse edal (SEQ ID

NO: 27), agafvh fhgvsniqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 28), gafvh fhgvsniqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 29), afvh fhgvsniqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 30), fvh fhgvsniqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 31), vh fhgvsniqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 32), h fhgvsniqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 33), fligvsniqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 34), hgvsnqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 35), gvsnlqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 36), vsnlqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 37), nlqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 38), lqef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 39), qef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 40), ef rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 41), f rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 42), rfmigggcse edal (SEQ ID NO: 43), y fmgggcse edal (SEQ ID NO: 44).

En ciertos casos, el receptor de adiponectina presente en el cuerpo no tiene la secuencia exacta que se describe en este documento, sino que está presente como una forma variante de origen natural. Por ejemplo, los receptores de adiponectina pueden sustituir al menos hasta 5% o incluso hasta 10% de sus aminoácidos sin tener una pérdida de la función. En consecuencia, al menos un par de los aminoácidos en las SEQ ID NOS: 1 a 44 pueden ser sustituidos con otros aminoácidos. Por consiguiente, la presente invención abarca no sólo los fragmentos 1 - 22 de AdipoR1 y AdipoR2, sino también los fragmentos que tienen una identidad sustancial con los fragmentos descrito en el presente documento. La identidad sustancial se describe en el presente documento como aquella que tiene aproximadamente 80% o una mayor identidad con los fragmentos. Por consiguiente, los fragmentos pueden tener aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, o aproximadamente 98% de identidad con las SEQ ID NOS: 1 - 44.

El porcentaje de identidad se puede determinar mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia del polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se presenta el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La identidad se evalúa usando cualquiera entre una variedad de algoritmos de comparación de secuencias y programas conocidos en la técnica. Tales algoritmos y programas incluyen, pero no se limitan de ninguna manera a, TBLASTN, BLASTP, FASFA, TFASTA, CLUSTALW, FASTDB, Pearson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 85: 2444 - 2448, 1988; Ahschul, et al., J. Mol. Biol., 215: 403 - 410, 1990; Thompson, et al., Nucleic Acids Res., 22: 4673 - 4680, 1994; Higgins, et al., Meth. Enzymol., 266: 383 - 402, 1996; Altschul, et al., Nature Genetics, 3: 266 - 272, 1993; Brutlag, et al., Comp. App. Biosci., 6: 237 - 24, 1990.

El término "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácido son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

Tal como se utiliza aquí, el término "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos aproximadamente 10 bases o pares de bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, y se entiende que incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

Los fragmentos del receptor de adiponectina descritos en este documento pueden dimerizarse a través del aminoácido cisteína presente cerca del terminal C del fragmento (posición 28 en la SEQ ID NO: 1 y 16). En consecuencia, estos fragmentos pueden estar presentes en el fluido corporal como dímeros.

Varios de los aminoácidos presentes en las SEQ ID NOS: 1 - 44 son sitios potenciales para modificación postraducciona. Por ejemplo, la glicina presente en los fragmentos (posición 26 en la SEQ ID NO: 1 y 23) es un sitio potencial de N-miristoilación, la arginina (posición 21 en la SEQ ID NO: 1 y 23) es un sitio potencial de N-glicano y la serina (posición 15 en la SEQ ID N: 1 y 23) es un sitio potencial de O-glicano. En consecuencia, los fragmentos pueden tener masa adicional debido a modificaciones postraduccionales.

Los presentes inventores han descubierto que fragmentos del receptor de adiponectina, un receptor transmembrana, pueden ser detectados en una muestra de fluido biológico analizando la presencia de una región del terminal C del receptor en el fluido biológico.

También se ha descubierto que el nivel de expresión del receptor de adiponectina en el tejido se puede determinar mediante la determinación del nivel de al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina en una muestra de fluido biológico y comparar el nivel de al menos un fragmento del terminal C con el nivel del mismo fragmento en una muestra de control.

También se ha descubierto que el nivel de expresión de adiponectina en un sujeto puede ser determinado por medio de la determinación del nivel de al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina en una muestra de fluido biológico y comparar el nivel de al menos un fragmento del terminal C con el nivel del mismo fragmento en una muestra de control.

5 Los fragmentos del receptor de adiponectina se pueden encontrar en los fluidos corporales de individuos enfermos y no enfermos. La presencia o el nivel de adiponectina, sin embargo, pueden afectar el patrón de fragmentación para el terminal C del receptor de adiponectina. Los niveles y el tipo de adiponectina en un sujeto también pueden afectar los niveles del receptor de adiponectina presentes en el sujeto.

10 Los presentes inventores han descubierto que en sujetos normales (es decir, no enfermos) que tienen niveles normales de adiponectina de longitud completa, se encuentran fragmentos más grandes del receptor de adiponectina en los fluidos biológicos, es decir, fragmentos que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 1, 2, 4 - 11, 23, 24, y / o 26 - 33). Estos fragmentos están típicamente no enlazados. Muchos de estos fragmentos más grandes están ausentes o presentes en niveles significativamente más bajos en sujetos que sufren de una enfermedad relacionada con adiponectina (es decir, están presentes fragmentos en pacientes enfermos en niveles 2x, 5x, 10x, 20x, 50x, 100x menos, o más de 100x menos que en pacientes no enfermos). Por fragmentos no enlazados, se entiende fragmentos que no están enlazados a la proteína portadora, es decir, la adiponectina.

20 Los presentes inventores han descubierto que en sujetos enfermos, se encuentran fragmentos de adiponectina más pequeños en los fluidos biológicos, es decir, fragmentos que tienen aproximadamente de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 3, 12 - 22, 25 y / o 34 - 44). Estos fragmentos pueden estar enlazados o no enlazados. Estos fragmentos se encuentran también en sujetos normales pero generalmente no en los mismos niveles que en sujetos enfermos (es decir, están presentes fragmentos en pacientes enfermos en niveles 1.5x, 2x, 2.5x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más que en los pacientes no enfermos).

25 Los presentes inventores han encontrado que tanto en sujetos normales como enfermos, se observan fragmentos del receptor de adiponectina del terminal C enlazados con adiponectina. Estos fragmentos del receptor enlazados pueden ser los fragmentos más grandes o más pequeños. En muchos casos, estos fragmentos estaban enlazados a la porción no globular de la adiponectina ya sea parcialmente fragmentada o de longitud completa. El nivel de fragmentos del receptor de adiponectina enlazados aumenta en pacientes con enfermedad.

30 La presencia y / o los niveles de los fragmentos enlazados y no enlazados y los fragmentos más pequeños y más grandes pueden, en consecuencia, ser utilizados para determinar el nivel de expresión de adiponectina y el receptor de adiponectina en un individuo así como los estados de enfermedad en los individuos.

III. Detección de fragmentos solubles del terminal C del receptor de adiponectina

35 Aquí se divulgan métodos para analizar la presencia o ausencia y / o para determinar el nivel de al menos un fragmento soluble del terminal C del receptor de adiponectina en fluido corporal. La frase "determinación del nivel" significa la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra o la cuantificación de la cantidad en términos relativos o absolutos. Una cantidad relativa podría ser, por ejemplo, alta, media o baja. Una cantidad absoluta podría reflejar la intensidad medida de una señal o la traducción de esta intensidad de señal en otro formato cuantitativo, tal como microgramos / ml.

40 Los fragmentos del terminal C pueden ser detectados por medio de cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, métodos ópticos, métodos electroquímicos (técnicas de voltametría y amperometría), microscopía de fuerza atómica, y métodos de radiofrecuencia, por ejemplo, espectroscopia de resonancia multipolar. Los métodos ópticos incluyen, por ejemplo, ensayos colorimétricos, espectroscopia de impedancia de electrones, microscopía, tanto confocal como no confocal, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia, y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmón de superficie, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de onda acoplador de rejilla o interferometría).

50 En ciertas realizaciones preferidas, el nivel de expresión, incluida la presencia o ausencia de al menos un fragmento soluble del terminal C del receptor de adiponectina se analizan mediante un inmunoensayo. Aquellos capacitados en la técnica son conscientes de que, en su contexto más amplio, un "inmunoensayo" comprende incubar una muestra de ensayo con una o más moléculas inmunointeractivas específicas para un objetivo durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para el enlazamiento a la misma y detectar dicho enlazamiento. Como se usa aquí, el término "objetivo" se refiere al analito para el cual se diseña una sonda con la cual enlazarse. En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, los métodos de detección empleados y el tipo y la naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Aquellos

capacitados en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológicos comúnmente disponibles, por ejemplo radioinmunoensayo, separación de inmunoabsorción ligada a una enzima, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrifugación, Ouchterlony a base de difusión, inmunoelectroforesis cohete en gel o inmunoensayos in situ pueden adaptarse fácilmente para el presente propósito.

- 5 Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un fragmento soluble del terminal C del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular, para determinar si el nivel de al menos un fragmento soluble del terminal C está alterado en comparación con los niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, tal inmunoensayo es de uso particular en la determinación de si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener otros usos también, tales como, por ejemplo, el uso en el seguimiento del avance de la enfermedad o el seguimiento de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita en el presente documento se extiende a todos aquellos usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren de dichos inmunoensayos para su funcionamiento.

- 15 A modo de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo generado contra el fragmento es inmovilizado sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y se pone en contacto una muestra biológica de ensayo de un paciente con la molécula enlazada. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario de anticuerpo, se añade entonces un segundo anticuerpo marcado con una molécula reportera capaz de producir una señal detectable y se incuba, dando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material sin reaccionar se elimina por lavado, y la presencia del complejo terciario se determina mediante la observación de una señal producida por la molécula reportera. Los resultados pueden ser ya sea cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden cuantificarse por comparación con un muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el cual se añaden se añaden simultáneamente tanto la muestra como el anticuerpo marcado al anticuerpo enlazado, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra que va a ser analizada se combinan primero, se incuban y luego añaden simultáneamente al anticuerpo enlazado. Estas técnicas son bien conocidas por aquellos capacitados en la técnica, y será fácilmente evidente la posibilidad de variaciones.

- 25 Por "molécula reportera", como se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende una molécula que, por su naturaleza química, produce una señal analíticamente identificable que permite la detección de un anticuerpo enlazado a un antígeno. La detección puede ser tanto cualitativa como cuantitativa. Las moléculas reporteras más comúnmente utilizadas en este tipo de ensayo son o bien partículas de látex coloreadas, partículas metálicas, enzimas, fluoróforos o moléculas que contienen radionúclidos (es decir radioisótopos).

- 35 El sustrato sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados celulosa, poliácridamida, nailon, nitrocelulosa, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en la forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para la realización de un inmunoensayo. Los procesos de enlazamiento son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en el entrecruzamiento en forma covalente, enlazamiento o adsorción física de la molécula con el portador insoluble.

- 40 Una variedad de formatos de inmunoensayo, incluyendo, por ejemplo, formatos de inmunoensayo competitivo y no competitivo, ensayos de captura de antígeno y ensayos de tipo sándwich de dos anticuerpos se pueden utilizar en los métodos de la invención (Self y Cook, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 60 - 65 (1996)). En un ensayo de captura de antígeno, se enlaza el anticuerpo a una fase sólida, y se añade la muestra de manera que un antígeno del fragmento soluble del terminal C del receptor de adiponectina es enlazado por el anticuerpo. La anticuerpo puede ser específico para uno o dos o más de los fragmentos solubles del terminal C. Después de remover las proteínas no enlazadas por lavado, se puede cuantificar la cantidad de antígeno enlazado, si se desea, usando, por ejemplo, un radioensayo (Harlow y Lane, Antibodies A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory: Nueva York, 1988)). Los inmunoensayos se pueden realizar bajo condiciones de exceso de anticuerpo, o como competiciones por el antígeno, para cuantificar la cantidad de antígeno y, por lo tanto, determinar un nivel de fragmentos solubles del terminal C del receptor de adiponectina.

- 50 Los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) pueden ser útiles en ciertos métodos de la invención. En el caso de un inmunoensayo enzimático, una enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Como se reconocerá fácilmente, sin embargo, existe una amplia variedad de diferentes técnicas de conjugación, que están fácilmente disponibles para una persona normalmente capacitada en la técnica. Las enzimas comúnmente usadas incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, β - galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que se utilizan con las enzimas específicas generalmente se eligen por la producción, después de la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, por ejemplo, que producen un producto fluorescente. Una enzima tal como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa o ureasa se pueden enlazar, por ejemplo, a un fragmento del terminal C del receptor de anti-adiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de

- rábano, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB), que produce un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Otros sistemas ligados a enzimas incluyen conveniente, por ejemplo, al sistema de detección de fosfatasa alcalina, que se puede utilizar, por ejemplo, con el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo para producir un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. Del mismo modo, un sistema de detección de β -galactosidasa se puede utilizar, por ejemplo, con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) para producir un producto soluble detectable a 410 nm, o se puede utilizar un sistema de detección de ureasa, por ejemplo, con un sustrato tal como urea - bromocresol púrpura (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO). Se pueden obtener anticuerpos primarios y secundarios útiles ligados a enzimas a partir de una cantidad de fuentes comerciales tales como Jackson Immuno -Research (West Grove, PA).
- En ciertas realizaciones, los fragmentos solubles del terminal C pueden ser detectados y medidos usando detección quimioluminiscente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se usan anticuerpos específicos de fragmentos del terminal C del receptor de adiponectina para capturar los fragmentos presentes en la muestra biológica y se usa un anticuerpo específico para los anticuerpos específicos y marcados con un marcador quimioluminiscente para detectar los fragmentos presentes en la muestra. Se puede utilizar cualquier sistema marcador y de detección quimioluminiscente en los presentes métodos. Los anticuerpos secundarios quimioluminiscentes pueden obtenerse comercialmente de diversas fuentes, tales como Amersham. Los métodos de detección de anticuerpos secundarios quimioluminiscentes son conocidos en la técnica y no se discuten en detalle en la presente invención.
- La detección fluorescente también puede ser útil para la detección de los fragmentos del receptor de adiponectina en ciertos métodos de la invención. Fluorocromos útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Agentes de enlazamiento específicos de α 2-MG, HA, TIMP-1 o YKL-40 marcados con fluoresceína o rodamina tales como anticuerpos anti- α 2-MG, anti-HA, anti-TIMP-1 o anti-YKL-40 anticuerpos, o anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína o rodamina pueden ser útiles en la invención. Los anticuerpos fluorescentes útiles se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, a través de Tago Immunologicals (Burlingame, CA) como se describe más adelante.
- Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente con anticuerpos sin alterar su capacidad de enlazamiento. Cuando se activan por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía lumínica, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz en un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico.
- Los radioinmunoensayos (RIA) también pueden ser útiles en ciertos métodos de la invención. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Los radioinmunoensayos se pueden realizar, por ejemplo, con el anticuerpo primario o secundario marcado con ^{125}I (Harlow y Lane, ver más arriba, 1988).
- Una señal de un reactivo detectable se puede analizar, por ejemplo, utilizando un espectrofotómetro para detectar color a partir de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar la radiación, tal como un contador gamma para la detección de ^{125}I ; o un fluorómetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de una cierta longitud de onda. Cuando se usa un ensayo ligado a enzimas, se puede llevar a cabo un análisis cuantitativo de la cantidad de fragmentos solubles del receptor de adiponectina utilizando un espectrofotómetro tal como un lector de microplacas EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ensayos de la invención pueden ser automatizados o realizados robóticamente, si se desea, y que la señal de múltiples muestras se puede detectar de forma simultánea.
- Los métodos de la invención también abarcan el uso de inmunoensayos basados en electroforesis capilar (CEIA), que se pueden automatizar, si se desea. Los inmunoensayos también se pueden utilizar junto con fluorescencia inducida por láser como se describe, por ejemplo, en Schmalzing y Nashabeh, *Electrophoresis* 18: 2184 - 93 (1997), y Bao, J. *Chromatogr. B. Biomed. Sci.* 699: 463 - 80 (1997). También se pueden utilizar inmunoensayos de liposomas, tales como inmunoensayos de liposomas de inyección de flujo e inmunosensores de liposomas, para detectar fragmentos solubles de adiponectina del terminal C o para determinar un nivel de fragmentos de adiponectina del terminal C de acuerdo con ciertos métodos de la invención (Rongen et al., *J. Immunol. Methods* 204: 105 - 133 (1997)).
- También pueden ser útiles inmunoensayos enzimáticos tipo sándwich en ciertos métodos de la invención. En un ensayo tipo sándwich de dos anticuerpos, un primer anticuerpo se enlaza a un soporte sólido, y se permite que el antígeno se enlace al primer anticuerpo. La cantidad de fragmentos solubles de adiponectina del terminal C se puede cuantificar midiendo la cantidad de un segundo anticuerpo que se enlaza con ella.
- También se pueden utilizar transferencia tipo Western cuantitativas para determinar un nivel de fragmentos solubles de adiponectina del terminal C en un método de la invención. Las transferencias tipo Western se pueden cuantificar por métodos bien conocidos tales como densitometría de barrido. Como ejemplo, las muestras de proteína se someten a electroforesis sobre geles Laemmli SDS-PAGE al 10%. Los anticuerpos monoclonales primarios de murino reaccionan con la transferencia, y el enlazamiento del anticuerpo confirmó ser lineal utilizando un experimento preliminar de transferencia de ranura. Se utilizan anticuerpos acoplados con peroxidasa de rábano antirratón de cabra (BioRad) como el anticuerpo secundario, y la detección de la señal se lleva a cabo usando

quimioluminiscencia, por ejemplo, con el kit de quimioluminiscencia Renaissance (New England Nuclear; Boston, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las autorradiografías de las transferencias se analizan utilizando un densitómetro de barrido (Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA) y se normalizan con un control positivo. Los valores se reportan, por ejemplo, como una relación entre el valor real para el control positivo (índice densitométrico). Tales métodos son bien conocidos en la técnica como se describe, por ejemplo, en Parra et al., J. Vasc. Surg. 28: 669 - 675 (1998).

Los niveles de fragmentos del receptor de adiponectina también se pueden determinar utilizando microarreglos de proteínas. Los métodos de producción de microarreglos de proteína que se pueden adaptar para la detección de los niveles de proteína en una muestra clínica se describen en la técnica (véase, por ejemplo, de Xiao et al. (2005) Mol Cell Endocrinol.; 230 (1-2): 95 -10; Protein Microarrays (2004) Mark Schena (Ed) Jones & Bartlett Publishers, Inc.). La publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003 / 0153013 describe métodos de detección de proteínas, por ejemplo, antígenos o anticuerpos, por medio de anticuerpos de inmovilización en un microarreglo de proteína sobre una membrana y poniendo en contacto el microarreglo con proteínas de detección que pueden unirse a las proteínas para formar complejos de proteína. Del mismo modo, la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2004 / 0038428 describe métodos de construcción de microarreglos de proteína.

En ciertas realizaciones preferidas, una muestra se analiza por medio de un biochip. Los biochips comprenden generalmente sustratos sólidos y tienen una superficie generalmente plana, a la cual se une un reactivo de captura (también llamado un adsorbente o reactivo de afinidad). Con frecuencia, la superficie de un biochip comprende una pluralidad de ubicaciones direccionables, cada uno de las cuales tiene el reactivo de captura enlazado allí.

Los biochips de proteína son biochips adaptados para la captura de péptidos. En el estado del arte se describen muchos biochips de proteína. Estos incluyen, por ejemplo, los biochips de proteína producidos por Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont, CA), Packard BioScience Company (Meriden CT), Zyomyx (Hayward, CA), Phylos (Lexington, MA) y Biacore (Uppsala, Suecia). Ejemplos de tales biochips de proteína se describen en las siguientes patentes o solicitudes de patente publicadas: la patente de los Estados Unidos No. 6.225.047; la publicación Internacional PCT No. WO 99/51773, la patente de los Estados Unidos No. 6.329.209, la Publicación Internacional PCT No. WO 00 / 56934 y la patente de los Estados Unidos No. 5.242.828.

Para el uso en la presente invención, los métodos de ensayo pueden implicar la captura de los fragmentos del receptor de adiponectina del terminal C sobre un sustrato sólido. Típicamente serán capturados utilizando un reactivo de captura bioespecífico tal como un anticuerpo y, en particular, un anticuerpo utilizado en un inmunoensayo. Los reactivos de captura bioespecíficos incluyen aquellas moléculas que enlazan a un analito objetivo con una afinidad, por ejemplo, de por lo menos 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. Estas moléculas también pueden ser capturadas con métodos no específicos, tales como materiales cromatográficos.

En ciertas realizaciones de la presente invención, al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina será detectado por espectrometría de masas. Ejemplos de espectrómetros de masas son de tiempo de vuelo, de sector magnético, de filtro de cuadrupolo, de trampa de iones, de resonancia ciclotrón de iones, un analizador de sector electrostático e híbridos de éstos.

Una técnica preferida de espectrometría de masas para uso en la invención es de "desorción y ionización por láser mejorado de superficie" o "SELDI", tal como se describe, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.719.060 y 6.225.047, ambas de Hutchens y Yip. Esta se refiere a un método de espectrometría de iones en fase gaseosa por desorción / ionización (por ejemplo, espectrometría de masas de desorción / ionización por láser) en la que se captura un analito en la superficie de una sonda de SELDI que se acopla a la interfaz de la sonda del espectrómetro de masas.

Una versión de SELDI es llamada "espectrometría de masas por afinidad". Esta versión implica el uso de sondas que comprenden una superficie absorbente (una "sonda de espectrometría de masas por afinidad"). En este contexto, "sonda" se refiere a un dispositivo adaptado para acoplarse a una interfaz de la sonda y para presentar un analito a la energía ionizante para ionización e introducción en un espectrómetro de masas. Una sonda incluye típicamente un sustrato sólido, ya sea flexible o rígido, que tiene una superficie de presentación de la muestra, sobre la que se presenta un analito a la fuente de energía de ionización.

Otra versión de SELDI es desorción ordenada mejorada de superficie ("SEND"), que implica el uso de sondas que comprenden moléculas de absorción de energía unidas a la superficie de la sonda ("sonda SEND"). La frase "moléculas de absorción de energía" (EAM) denota moléculas que son capaces de absorber la energía de una fuente de desorción / ionización por láser y, después de eso, que contribuyen a la desorción y ionización de moléculas de analito en contacto con la misma. La categoría EAM incluye moléculas utilizadas en MALDI, que frecuentemente se denomina como "matriz", y se ejemplifica por medio de derivados del ácido cinámico, derivados de ácido sinapínico (SPA), ácido ciano-hidroxi-cinámico (CHCA) y ácido dihidroxibenzoico, ácido ferúlico y hidroxiacetofenona. En ciertas realizaciones, la molécula de absorción de energía se incorpora en un polímero entrecruzado lineal, por ejemplo, un polimetacrilato. Por ejemplo, la composición puede ser un copolímero de un

ácido a-ciano-4-metacrililoiloxicinámico y acrilato. En otra forma de realización, la composición es un copolímero de un ácido a-ciano-4-metacrililoiloxicinámico, acrilato y 3-(tri-etoxi) silil propil metacrilato. En otra forma de realización, la composición es un copolímero de ácido a-ciano-4-metacrililoiloxicinámico y octadecilmetacrilato ("C 18 SEND"). SEND se describe más ampliamente en la patente de los Estados Unidos No. 6.124.137.

- 5 Se puede usar una "superficie selectiva" para capturar los fragmentos para el análisis SELDI. La superficie selectiva tiene un "adsorbente", también llamado una "fracción de enlazamiento" o "reactivo de captura" unido a la superficie. Un "adsorbente" o "reactivo de captura" o "fracción de enlazamiento", pueden ser cualquier material capaz de unirse a un analito. El reactivo de captura se puede unir directamente al sustrato de la superficie selectiva, o el sustrato puede ser una "superficie reactiva" que porta una "fracción reactiva" que es capaz de unirse al reactivo de captura, por ejemplo, a través de una reacción que forma un enlace covalente o covalente coordinado. El epóxido y el carbodiimidazol son fracciones reactivas útiles para unirse covalentemente con reactivos de captura polipeptídicos tales como anticuerpos o receptores celulares. El ácido nitriloacético y el ácido iminodiacético son fracciones reactivas útiles que funcionan como agentes quelantes para unir iones metálicos que interactúan de forma no covalente con péptidos que contienen histidina.
- 10
- 15 En ciertas realizaciones, el adsorbente utilizado para capturar los fragmentos del receptor de adiponectina del terminal C comprende un reactivo de captura bioespecífico. Un "adsorbente bioespecífico" se refiere a un adsorbente que se une a un analito con una afinidad de al menos 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. El reactivo de captura bioespecífico preferido es un anticuerpo o un fragmento de enlazamiento del mismo. Este incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de ellos bien conocidos en la técnica, tales como, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, y proteínas scFv. Otros reactivos de captura bioespecíficos incluyen aficuerpos (Affibody, Teknikringen 30, piso 6, Casilla 700 04, Estocolmo SE-10044, Suecia, patente de los Estados Unidos No. 5.831.012; véase también Surface Logix, Inc., 50 Soldiers Field Place, Brighton, MA 02135 y Hodneland, C. D, et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 5048 - 5052).
- 20

- 25 Los fragmentos de la presente invención pueden ser capturados sobre adsorbentes cromatográficos. "Adsorbentes cromatográficos" se refiere a un material adsorbente utilizado típicamente en cromatografía. Los adsorbentes cromatográficos incluyen, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa, materiales de intercambio iónico, quelantes metálicos (por ejemplo, ácido nitriloacético o ácido iminodiacético), quelatos metálicos inmovilizados, adsorbentes de interacción hidrófoba, adsorbentes de interacción hidrofílica, colorantes, biomoléculas simples (por ejemplo, nucleótidos, aminoácidos, azúcares simples y ácidos grasos) y adsorbentes mixtos (por ejemplo, adsorbentes de atracción hidrófoba / de repulsión electrostática).
- 30

- En ciertas realizaciones, se pone en contacto un sustrato con un adsorbente con la muestra, por ejemplo, suero del paciente, durante un período de tiempo suficiente para permitir que los analitos objetivo que pueden estar presentes se enlacen con el adsorbente. Después de un período de incubación, se lava el sustrato para remover el material no enlazado. Se puede utilizar cualquiera de las soluciones de lavado adecuadas; preferiblemente, se emplean soluciones acuosas. La medida en la que las moléculas se mantienen enlazadas puede ser manipulada ajustando la rigurosidad del lavado. Las características de elución de una solución de lavado pueden depender, por ejemplo, del pH, la fuerza iónica, la hidrofobicidad, el grado de caotropismo, la fuerza detergente, y la temperatura. A menos que la sonda tenga propiedades tanto SEAC como SEND, se aplica entonces una molécula de absorción de energía al sustrato con los analitos objetivo enlazados.
- 35

- 40 Las biomoléculas enlazadas a los sustratos se pueden detectar en un espectrómetro de iones en fase gaseosa, tal como un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo. Los analitos objetivo se pueden ionizar por medio de una fuente de ionización tal como un láser, se recolectan los iones generados por medio de un montaje óptico de iones, y luego un analizador de masas dispersa y analiza los iones que pasan. El detector luego traduce la información de los iones detectados en relaciones de masa a carga. La detección de un analito objetivo implicará típicamente la detección de la intensidad de la señal. Por lo tanto, se pueden determinar tanto la cantidad como la masa del analito objetivo.
- 45

- En otro método de espectrometría de masas, se pueden capturar primero los analitos objetivo sobre una resina cromatográfica que tiene propiedades cromatográficas que enlazan los analitos objetivo, por ejemplo, un anticuerpo o anticuerpos. En el presente ejemplo, esto puede incluir una resina inmunocromatográfica que comprende anticuerpos que se enlazan con los fragmentos del receptor de adiponectina del terminal C. El material no enlazado se puede lavar de la resina. Luego se pueden eluir los analitos objetivo de la resina. Finalmente, los analitos objetivo eluidos se pueden detectar mediante MALDI o por SELDI.
- 50

- El análisis de los analitos mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo genera un espectro de tiempo de vuelo. El espectro de tiempo de vuelo analizado en último lugar no representa típicamente la señal de un solo pulso de energía ionizante contra una muestra, sino más bien la suma de las señales de una cantidad de impulsos. Esto reduce el ruido y aumenta el rango dinámico. Estos datos de tiempo de vuelo se someten luego a un procesamiento de datos.
- 55

Los datos generados por desorción y detección de los analitos objetivo pueden ser analizados con el uso de un ordenador digital programable. El programa de ordenador analiza los datos para indicar el número de proteínas detectadas, y opcionalmente la intensidad de la señal y la masa molecular determinada para cada analito objetivo detectado. El análisis de los datos puede incluir etapas de determinación de la intensidad de la señal de un analito objetivo y la eliminación de datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada. Por ejemplo, los picos observados se pueden normalizar, mediante el cálculo de la altura de cada pico con relación a algunos de referencia. La referencia puede ser generada por ruido de fondo por parte del instrumento y de productos químicos tales como la molécula de absorción de energía que se fija como cero en la escala.

El análisis generalmente involucra la identificación de picos en el espectro que representan la señal de un analito. La selección del pico puede hacerse visualmente, pero hay disponible un programa que puede automatizar la detección de picos. En general, este programa funciona mediante la identificación de las señales que tienen una relación de señal a ruido por encima de un umbral seleccionado y marcando la masa del pico en el centro geométrico de la señal del pico. En una aplicación útil se comparan muchos espectros para identificar picos idénticos presentes en un porcentaje seleccionado de los espectros de masas. Una versión de este programa agrupa todos los picos que aparecen en los distintos espectros dentro de un rango de masa definido, y asigna una masa (M / Z) a todos los picos que están cerca del punto medio de la agrupación de masas (M / Z).

El programa usado para analizar los datos puede incluir un código que aplica un algoritmo a los análisis de la señal para determinar si la señal representa un pico en una señal que corresponde a un analito objetivo de acuerdo con la presente invención. El programa también puede someter los datos relacionados con picos de analitos objetivo observados para el árbol de clasificación o análisis ANN, para determinar si está presente un pico de un analito objetivo o combinación de picos de analito objetivo que indica el estado de la enfermedad cardiovascular. El análisis de los datos puede ser "afinado" a una variedad de parámetros que se obtienen, ya sea directa o indirectamente, a partir del análisis espectrométrico de masas de la muestra. Estos parámetros incluyen, pero no se limitan a, la presencia o ausencia de uno o más picos, la forma de un pico o grupo de picos, la altura de uno o más picos, el logaritmo de la altura de uno o más picos, y otras manipulaciones aritméticas de los datos de altura de los picos, más picos, la forma de un pico o grupo de picos, la altura e uno o más picos, el logaritmo de la altura de uno o más picos, y otras manipulaciones aritméticas de los datos de altura de los picos.

IV. Anticuerpos

Se divulgan además anticuerpos que se enlazan específicamente a los fragmentos del terminal C del receptor de adiponectina. Los métodos para elaborar anticuerpos que tienen especificidad de enlazamiento con péptidos seleccionados son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, tales anticuerpos se pueden seleccionar mediante la inmunización de un animal con la molécula objetivo, la generación de anticuerpos, y análisis de los anticuerpos para identificar si un anticuerpo particular se enlaza con la molécula objetivo. Los anticuerpos que se enlazan con la molécula objetivo se pueden seleccionar. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos monoclonales contra estas moléculas.

La frase "se enlaza específicamente con" se refiere a una reacción de enlazamiento que es determinante de la presencia de un objetivo en presencia de una población heterogénea de otros compuestos biológicos. Por lo tanto, bajo condiciones de ensayo designadas, la región de enlazamiento se enlaza preferentemente con un objetivo particular y no se enlaza en una cantidad significativa con otros componentes presentes en una muestra de ensayo. El enlazamiento específico a un objetivo bajo tales condiciones puede requerir una fracción de enlazamiento que se selecciona por su especificidad por un objetivo particular. Se pueden utilizar una variedad de formatos de ensayo para seleccionar regiones de enlazamiento que son específicamente reactivas con un analito en particular. Típicamente, una reacción específica o específica será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y más típicamente más de 10 veces la de fondo.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$ y Fv), siempre y cuando ellos exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpo se pueden marcar para uso en ensayos biológicos (por ejemplo, marcadores de radioisótopos, marcadores fluorescentes) para ayudar en la detección del anticuerpo.

Los anticuerpos se pueden marcar / conjugar con moléculas reporteras para uso en ensayos biológicos (por ejemplo, marcadores de radioisótopos, marcadores fluorescentes) para ayudar en la detección de los fragmentos descritos en el presente documento.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un su especificidad, los

anticuerpos monoclonales son convenientes porque son sintetizados por el cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por ser obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan de acuerdo con la presente invención pueden ser elaborados por el método del hibridoma descrito primero por Kohler, et al., Nature, 256: 495, 1975, o pueden ser elaborados por medio de métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4.816.567, de Cabilly, et al.). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson, et al., 624 - 628, 1991; Marks, et al., J. Mol Biol., 222: 581 - 597, 1991, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y / o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase particular de anticuerpo o subclase, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que ellos exhiban la actividad biológica deseada (Cabilly, et al., ver más arriba; Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 81: 6851 - 6855, 1984).

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante diversas técnicas familiares para aquellos capacitados en la técnica. En resumen, se immortalizan células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler, et al., Eur. J Immunol. 6: 511 - 519, 1976). Los métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros métodos bien conocidos en el arte. Las colonias que surgen de células immortalizadas individuales se seleccionan para la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células se puede mejorar mediante diferentes técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado. Alternativamente, se pueden aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de enlazamiento del mismo mediante el cribado de una biblioteca de ADN a partir de células B humanas de acuerdo con el protocolo general expuesto por Huse, et al., Science, 246: 1275 - 1281, 1989.

Los anticuerpos monoclonales y sueros policlonales pueden ser recogidos y titulados contra la proteína del inmunógeno en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Típicamente, se seleccionan los antisueros policlonales con un título de 10^4 o superior y ensayan por su reactividad cruzada contra el uso de un inmunoensayo de enlazamiento competitivo. Los antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales específicos usualmente se enlazarán con una K_d de al menos aproximadamente 0,1 mM, más usualmente al menos aproximadamente 1 μ M, preferiblemente al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y lo más preferiblemente, 0,01 μ M o mejor.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂; u otras subsecuencias de anticuerpos de enlazamiento de antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan los residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo del receptor ni en las secuencias de CDR o del marco importadas. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones, et al., Nature, 321: 522 - 525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323 - 329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593 - 596, 1.992. El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo Primatized^{MR} en el que la región de enlazamiento al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido por inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

Una cantidad de inmunógenos que comprenden porciones de los fragmentos descritos en la presente invención pueden ser utilizados para producir anticuerpos específicamente reactivos con los fragmentos. Por ejemplo, un fragmento de la presente invención, puede ser aislado utilizando técnicas conocidas en la técnica. Una proteína recombinante puede ser expresada en células eucariotas o procarioras como se describió anteriormente, y purificada como se describe generalmente más arriba. Una proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. Alternativamente, un péptido sintético derivado de las secuencias divulgadas en la presente invención y conjugado con una proteína portadora puede ser usado como

inmunógeno. También se puede utilizar una proteína de origen natural ya sea en forma pura o impura. El producto es luego inyectado en un animal capaz de producir anticuerpos. Se pueden general ya sea anticuerpos monoclonales o policlonales, para uso posterior en inmunoensayos para medir la proteína.

5 Los métodos de producción de anticuerpos policlonales son conocidos por aquellos capacitados en el arte. Una cepa endogámica de ratones (por ejemplo, Ratones BALB/C) o conejos se inmuniza con la proteína usando un adyuvante estándar, tal como adyuvante de Freund, y protocolo de inmunización estándar. La respuesta inmune del animal a la preparación del inmunógeno se controla tomando muestras de sangre para análisis y determinando el título de reactividad para las subunidades beta. Cuando se obtienen títulos apropiadamente altos de anticuerpo para el inmunógeno, se recolecta sangre del animal y se preparan antisueros. Puede hacerse si se desea un fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecer en anticuerpos reactivos a la proteína (véase, Harlow y Lane, más arriba).

15 En una forma de realización adicional, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty, et al., Nature, 348: 552 - 554, 1990; Clackson, et al., Nature, 352: 624 - 628. 1991; Marks, t al., J. Mol. Biol., 222: 581 - 597, 1991, describen el aislamiento de anticuerpos humanos y de murino, respectivamente, usando bibliotecas de fago. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por arrastre de cadena (Mark et al., Bio-Technology, 10: 779 - 783, 1992), así como la infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para la construcción de bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse, et al., Nuc. Acids. Res., 21: 2265 - 2266, 1993). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables para las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonal para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

20 En ciertas formas de realización, los anticuerpos se seleccionan para distinguir entre un fragmento del receptor de adiponectina del terminal C y otro, es decir, los anticuerpos se seleccionan para que se enlacen específicamente con una forma, pero no otra, bajo las mismas condiciones de ensayo.

25 De acuerdo con ello, la presente divulgación proporciona un anticuerpo que se enlaza específicamente con un epítipo de un fragmento del receptor de adiponectina que tiene la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se enlazará específicamente con una región de la SEQ ID NO: 1 que está fuera del dominio de enlazamiento de adiponectina, es decir, el anticuerpo se enlazará específicamente con un epítipo dentro de los residuos 1 - 22 de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se enlazará específicamente a un epítipo dentro de lo dentro de 1 - 14, 2 - 14, 2 - 14, 3 - 14, 4 - 14, 5 - 14, 6 - 14, 7 - 14, 8 - 14, 9 - 14, 10 - 14, 14 - 22 o dentro de los residuos 23 - 34 de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se enlazará con un epítipo presente en una de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se enlazará específicamente con una región de la SEQ ID NOs: 1 - 12 que está fuera del dominio de enlazamiento de la adiponectina.

35 La presente invención también proporciona un anticuerpo que se enlaza específicamente con un epítipo de un fragmento del receptor de adiponectina que tiene la SEQ ID NO: 23. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se enlazará específicamente con una región de la SEQ ID NO: 23 que está fuera del dominio de enlazamiento de la adiponectina, es decir, el anticuerpo se enlazará específicamente con un epítipo dentro de los residuos 1 - 22 de la SEQ ID NO: 23. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se enlazará específicamente con un epítipo dentro de los residuos 1 - 14, 2 - 14, 2 - 14, 3 - 14, 4 - 14, 5 - 14, 6 - 14, 7 - 14, 8 - 14, 9 - 14, 10 - 14, 14 - 22 o dentro de los residuos 23 - 34 de la SEQ ID NO: 23. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se enlazará con un epítipo presente en una de las SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, o 44. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se enlazará específicamente región de las SEQ ID NOs: 23 - 44 que está fuera del dominio de enlazamiento de la adiponectina.

V. Correlación de los fragmentos de receptor de la adiponectina con estados de enfermedad

45 Para ciertos métodos descritos en el presente invención, el nivel de al menos un fragmento soluble del receptor de adiponectina se determina en diferentes muestras de pacientes para las cuales se desea y sea información del diagnóstico o del pronóstico, para proporcionar perfiles. Un perfil de una muestra particular es esencialmente una "huella digital" del estado de la muestra. Un estado normal se puede distinguir de un estado de enfermedad y dentro de los estados de enfermedad, se pueden determinar diferentes estados de pronóstico (por ejemplo prospectos de supervivencia buenos o pobres a largo plazo). El diagnóstico puede hacerse o confirmarse por comparación de muestras del paciente con los perfiles conocidos. Evaluando la evolución de fragmentos solubles del receptor de adiponectina en diferentes omentos durante el transcurso de la enfermedad, se puede determinar la etapa de la enfermedad puede ser determinada, así como el pronóstico probable.

55 Un principio de ensayo de diagnóstico es la correlación de los resultados de un procedimiento con parámetros clínicos particulares. La correlación necesariamente involucra una comparación entre dos o más grupos que se distinguen por el parámetro clínico. Un parámetro clínico podría ser, por ejemplo, la presencia o la ausencia de enfermedad, riesgo de la enfermedad, etapa de la enfermedad, severidad de la enfermedad, clase de enfermedad o

respuesta al tratamiento de la enfermedad de acuerdo con ello. Por lo tanto, la persona que hace el diagnóstico utiliza esta correlación para calificar el estado de un sujeto con respecto al parámetro clínico. Es decir, la persona que hace el diagnóstico utiliza los resultados de un procedimiento sobre un sujeto para clasificar o diagnosticar el estado de un sujeto con respecto a un parámetro clínico, estando la confiabilidad del diagnóstico/clasificación relacionado con el poder para clasificar o dividir los signos o síntomas utilizado en ensayo.

Los métodos descritos aquí para calificar o cuantificar los fragmentos solubles del receptor de adiponectina proporcionan información que puede ser correlacionada con condiciones patológicas, predisposición a una enfermedad, control terapéutico, estratificación del riesgo, entre otros.

Los presentes métodos son particularmente útiles para condiciones de diagnóstico, para evaluación si ciertos fármacos tendrán un efecto deseado, y determinar un pronóstico. Los presentes métodos pueden ser utilizados para detección temprana de enfermedades, así como para la optimización de los protocolos de tratamiento. Preferiblemente, la condición, es decir el estado de la enfermedad, estará asociada con patrones anormales de fragmentación de un receptor de adiponectina.

Para el uso en la presente invención, "diagnostico de una condición" se refiere a la determinación de si un sujeto tiene o no una mayor probabilidad de tener una condición especificada. Las pruebas que se utilizan para diagnosticar una condición, tal como los ensayos descritos aquí, en ciertos casos, pueden no ser aptos para diagnosticar una condición por sí mismas pero son útiles en combinación con otras pruebas para diagnosticar una condición. Por lo tanto, "diagnóstico de una condición" se entiende que incluye cualquier de los métodos que también ayudan en el diagnóstico de una condición.

En ciertas formas de realización, la invención proporciona métodos para controlar el progreso del estado de la enfermedad en un paciente. El método comprende típicamente las etapas de proporcionar una primera muestra biológica del paciente, preferiblemente una muestra de orina, plasma sanguíneo, suero sanguíneo y/o sangre entera, midiendo al menos un fragmento soluble del receptor de adiponectina en una primera muestra biológica en un primer momento, proporcionando una segunda muestra biológica del paciente, midiendo el fragmento soluble del receptor en la segunda muestra biológica en un segundo momento, y determinando el progresión del estado de la enfermedad en el paciente con base en el cambio en la cantidad del fragmento del receptor de adiponectina o con base en la comparación con mediciones a partir de una población de control. Midiendo los fragmentos solubles del receptor en una muestra del paciente con el tiempo, un médico será capaz de determinar si el estado de la enfermedad ha empeorado o mejorado. Un médico puede por lo tanto utilizar estas mediciones para confeccionar apropiadamente un tratamiento. Los métodos para controlar el progreso del estado de la enfermedad comprenden la determinación del nivel de al menos un fragmento soluble del terminal C se pueden combinar con otras pruebas para controlar el progreso del estado de la enfermedad.

Los presentes inventores han descubierto que los sujetos que tienen un desequilibrio de adipocitos tienen diferentes patrones de fragmentos de receptor adiponectina en sangre que los sujetos normales. La presente invención también proporciona métodos para determinar si un sujeto tiene un desequilibrio de adipocitos determinando los niveles de al menos un fragmento del receptor de adiponectina en una muestra de un fluido corporal del sujeto.

Por ejemplo, con el propósito de determinar si un sujeto tiene un desequilibrio de adipocitos, se podrían determinar una vez los niveles del fragmento descritos aquí. En ciertas realizaciones, la ausencia o la presencia de solamente niveles muy bajos de ciertos fragmentos, es decir, fragmentos que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, SEQ ID NOS: 1, 2, 4 - 11, 23, 24, y 26 - 33) y generalmente no enlazados serán indicativos de un aumento de la probabilidad de tener un desequilibrio de adipocitos. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un equilibrio normal de los adipocitos. En ciertas realizaciones, la presencia de mayores cantidades de ciertos fragmentos más pequeños, es decir, fragmentos no enlazados que tienen de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOS: 3, 12 - 22, 25, y 34 - 44) será indicativa de un aumento de la probabilidad de tener un desequilibrio de adipocitos. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un equilibrio normal de adipocitos. La presencia de mayores niveles totales de fragmentos del receptor de adiponectina, es decir, concentración total de fragmentos de receptor de adiponectina, será indicativa de una probabilidad respectiva de tener un desequilibrio de adipocitos.

A medida que los niveles en sangre de adiponectina disminuyen, aumenta el porcentaje de pacientes con la enfermedad. En pacientes con niveles en sangre de adiponectina aproximadamente menores a 4,0 µg/mL, el número de pacientes diagnosticados con el síndrome metabólico aumenta también el riesgo de enfermedad de las arterias coronarias. Por ejemplo, un sujeto que tiene niveles en sangre de adiponectina menores o iguales aproximadamente a 4,0 µg/mL tiene una mayor probabilidad de tener enfermedad de la arteria coronaria, en comparación con un sujeto que tiene niveles en sangre de adiponectina mayores a 4,0 µg/mL (la relación en exceso es superior a 3,0 para hombres y mujeres o superior a 1,7 en hombres y superior a 10 en mujeres) El término adiponectina se refiere a la adiponectina total medida incluyendo monómeros de longitud completa, porciones globulares y no globulares así como oligómeros de adiponectina. Los umbrales se pueden ajustar para ensayos específicos capaces de medir formas individuales.

Midiendo los niveles de estos fragmentos en una muestra de fluido biológico obtenida de un sujeto en diferentes momentos, se puede determinar si el desequilibrio de adipocitos está mejorando o empeorando. En forma similar, midiendo los niveles de estos fragmentos antes y después de la intervención terapéutica, se puede determinar si la terapia es efectiva.

- 5 La adiponectina es una adipocito implicado en una cantidad de estados de enfermedad, incluyendo, por ejemplo, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo II, síndrome metabólico, dislipidemia, enfermedad cardiovascular e hipertensión. Para uso en la presente invención, un sujeto que tiene hipoadiponectinemia tiene concentraciones reducidas de adiponectina en plasma comparado con sujetos normales. Los sujetos que tienen hipoadiponectinemia pueden ser identificados usando los presentes métodos. Los presentes métodos pueden ser usados para determinar
- 10 el inicio de la hipoadiponectinemia, el avance de la hipoadiponectinemia, y/o la eficacia del tratamiento de la hipoadiponectinemia en un sujeto. En forma similar, los presentes métodos pueden ser usados para determinar el inicio de una condición caracterizada por hipoadiponectinemia, el avance de una condición caracterizada por hipoadiponectinemia, y/o la eficacia de un tratamiento de una condición caracterizada por hipoadiponectinemia en un sujeto.
- 15 Por ejemplo, con el propósito de determinar si un sujeto tiene hipoadiponectinemia, se pueden determinar los niveles del fragmento descrito en la presente invención. En ciertas realizaciones, la ausencia o presencia de mayores niveles de ciertos fragmentos, es decir, generalmente de fragmentos no enlazados que tienen aproximadamente de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 3, 12 - 22, 25 y/o 34 - 44) será indicativa de una mayor probabilidad de tener hipoadiponectinemia. En ciertas realizaciones, la presencia de menores cantidades de ciertos
- 20 fragmentos más grandes, es decir, generalmente fragmentos no enlazados que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 1, 2, 4 - 11, 23, 24, y/o 26 - 33) será indicativa de una mayor probabilidad de tener hipoadiponectinemia. La presencia de mayores niveles de fragmentos total del receptor de adiponectina, enlazados o no enlazados a la proteína portadora, es decir, adiponectina, será generalmente indicativa de una probabilidad respectiva de tener hipoadiponectinemia.
- 25 Midiendo los niveles de estos fragmentos en una muestra de fluido biológico tomada de un sujeto en diferentes momentos, puede determinarse si la hipoadiponectinemia está mejorando o empeorando. En forma similar, mediante la medición de los niveles de estos fragmentos, antes y después de la intervención terapéutica, se puede determinar si la terapia es efectiva.
- 30 La sensibilidad normal a la insulina resulta cuando la insulina provoca que las células grasas produzcan adiponectina. La adiponectina de longitud total se agrega en multímeros, típicamente llamadas formas LMW, MMW y HMW. La adiponectina interactúa con el receptor 2 de adiponectina en el hígado y con el receptor 1 de adiponectina en el músculo para detener la producción de glucosa y causar glucólisis y oxidación de ácidos grasos. El receptor 1 de adiponectina reacciona con una forma escindida de adiponectina llamada adiponectina globular en donde el receptor 2 de adiponectina reacciona con adiponectina de longitud completa. Recientemente se demostró por parte
- 35 de otros que la se formar por acción de la elastasa en sangre.
- La resistencia a la insulina se presenta cuando los adipocitos se vuelven hipertróficos y producen menos adiponectina en respuesta a la insulina. En este estado, las células se vuelven más apoptótica y se hace más lenta la división celular. Como resultado, disminuyen los niveles de adiponectina en plasma. Los niveles de insulina se elevan en un esfuerzo o provocar que las células liberen más adiponectina. Sin embargo, a medida que la
- 40 resistencia a la insulina empeora se produce más insulina y menos adiponectina. La disminución de la adiponectina trae como consecuencia una menor glicólisis y una menor oxidación de ácidos grasos en el músculo y evita que se detenga la producción de glucosa en el hígado.
- Para uso en la presente invención, la resistencia a la insulina se refiere a una disminución en un individuo en la acción biológica de la insulina *in vivo* de acuerdo a lo evaluado por la tasa de disposición de la glucosa el torrente sanguíneo (por ejemplo, en tejido sensible a la insulina, tal como músculo, grasa e hígado).
- 45 La diabetes mellitus se define como hiperglicemia crónica debido a una secreción y/o acción defectuosa de la insulina. Las dos clasificaciones principales de la enfermedad son de tipo I, que implica la destrucción de células beta pancreáticas, usualmente por un proceso autoinmune, y tipo II, y efectividad fisiológica de la insulina, es decir, resistencia a la insulina. La diabetes mellitus es a menudo diagnosticada primero por la demostración de hiperglucemia a través del uso de determinaciones aleatorias o de glucosa en plasma en ayunas, o por medio de un ensayo de tolerancia a la glucosa oral. Las pruebas de tolerancia a la glucosa no miden la resistencia a la insulina.
- 50 Una vez que se diagnostica la diabetes, se pueden utilizar los análisis para insulina y péptido C para diferenciar entre diabetes tipo I y tipo II, y entre diabetes de tipo II, para distinguir aquellos que requieren tratamiento con insulina a partir de aquellos que pueden ser manejados con cambios en los patrones de dieta y ejercicio. Es difícil distinguir entre aquellos que necesitan tratamiento con insulina de los casos límite que pueden ser manejados solo con cambios en la dieta y el ejercicio.
- 55

La insulina es una hormona polipeptídica liberada por las células beta pancreáticas para reducir los niveles de glucosa en sangre promoviendo la captación celular de la glucosa y suprimiendo la glucosa endógena. El precursor inmediato de la insulina es la proinsulina (MW, 9 kDa), un polipéptido de una sola cadena que consiste de 86 aminoácidos con tres puentes disulfuro. La escisión proteolítica produce insulina (MW, 6 kDa) que consiste de 51 aminoácidos en dos cadenas unidas por dos puentes disulfuro; y el péptido de conexión (péptido C; MW, 3 kDa), una sola cadena de péptido que contiene 31 aminoácidos. Se secretan luego al torrente sanguíneo cantidades equimolares de insulina y de péptido C. Las concentraciones en el torrente sanguíneo del péptido C son aproximadamente 5 a 10 veces mayores que aquellas de insulina como resultado de la vida media mucho más larga del péptido C. El péptido C es por lo tanto una medida de la producción de insulina en forma natural por el organismo y puede ser medido en presencia de insulina sintética intravenosa.

El estándar de oro para la medición de la resistencia a la insulina es el método de represión de la glucosa (valor M) para medir la velocidad de infusión de la glucosa (GIR) ajustada por la velocidad de infusión de insulina (IIR) para mantener un nivel de glucosa en sangre. Una segunda medida común es glucosa en ayunas y la insulina (HOMA - IR). Se ha reportado que el valor M (como el determinado por medio del método de represión de la glucosa, un estándar de oro) se correlaciona con los niveles en sangre de adiponectina que muestran que la adiponectina puede ser un indicador para la resistencia a la insulina. Una correlación adicional es la medición de la glucosa en ayunas y de los niveles de insulina en sangre corregidos por la adiponectina (FBS x FIRI / AND) (glucosa en sangre en ayunas x nivel de insulina en ayunas / adiponectina).

Los presentes métodos pueden ser utilizados para identificar sujetos que tienen resistencia a la insulina. Además, se pueden utilizar los presentes métodos para determinar la severidad de la resistencia a la insulina en sujetos diabéticos y para recomendar el tratamiento apropiado.

Por ejemplo, con el propósito de determinar si un sujeto tiene resistencia a la insulina, se pueden determinar los niveles del fragmento descrito en la presente invención. En ciertas realizaciones, la ausencia o la presencia de menores niveles de ciertos fragmentos, es decir, fragmentos que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud, y que generalmente no están enlazados, (es decir, las SEQ ID NOS: 1, 2, 4 - 11, 23, 24, y/o 26 - 33) será indicativa de una probabilidad mayor de tener resistencia a la insulina. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un estado normal. En ciertas realizaciones, la presencia de mayores niveles de ciertos fragmentos más pequeños, es decir, fragmentos no enlazados que tienen de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOS: 3, 12 - 22, 25, y/o 34 - 44) será indicativa de una mayor probabilidad de tener resistencia a la insulina. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un estado normal. Un aumento en la concentración total de fragmentos de receptores de adiponectina (enlazados o no enlazados) a la proteína portadora, es decir, adiponectina, es generalmente indicativa de una mayor probabilidad de tener resistencia a la insulina.

Mediante la medición de los niveles de estos fragmentos en una muestra de fluido biológico tomada de un individuo en diferentes momentos, se puede determinar si la resistencia a la insulina se mejora o se empeora. En forma similar, mediante la medición de los niveles de estos fragmentos antes y después de la intervención terapéutica, se puede determinar si la terapia es efectiva.

El síndrome metabólico se ha asociado con niveles reducidos de adiponectina en plasma y puede ser controlado utilizando los métodos de la presente invención. El síndrome metabólico, también conocido como síndrome X, es un conjunto de factores de riesgo culpable por el exceso de morbilidad de la enfermedad cardiovascular entre pacientes con sobre peso y obesos y pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Tanto la Organización Mundial de la Salud como el Programa Nacional para Educación sobre el Colesterol - Patente de Tratamiento de Adultos (NCEP - ATP III) han expuesto criterios de diagnóstico para el síndrome metabólico. Para uso en la presente invención, el síndrome metabólico está definido por los criterios de diagnóstico de la OMS como se presenta a continuación (Darwin Deen, American Family Physician, 69 (12) (2004) 2875 - 2882).

Tabla 1

Criterios de diagnóstico para el síndrome metabólico de acuerdo con la OMS	
Componente	Criterios de diagnóstico de la OMS (resistencia a la insulina* más dos de los siguientes)
Obesidad abdominal/central	Relación de la cintura con respecto a las caderas: >0,90 (hombres), >0,85 (mujeres), o BMI >30 kg per m ²
Hipertrigliceridemia	≥ 150 mg por dL (≥ 1,7 mmoles por L)
Colesterol HDL bajo	< 35 mg por dL (< 0.9 mmoles por L) para hombres, < 39 mg por dL (<1,0 mmoles por L) para mujeres
Presión sanguínea alta	≥ 140/90 mm de Hg o el uso documentado de terapia antihipertensiva
Glucosa en ayunas alta	tolerancia desmejorada de la glucosa, glucosa desmejorada en ayunas, resistencia a la insulina, o diabetes
Microalbuminuria	Relación de albumina urinaria con respecto a creatinina: 30 mg por g, o relación de excreción de albumina: 20 mcg por minuto
OMS = Organización Mundial de la Salud; ATP = Panel de Tratamiento de Adultos; BMI = Índice de Masa Corporal; HDL = Lipoproteína de Alta Densidad.	
*La resistencia a la insulina es identificada por la diabetes mellitus tipo II o glucosa desmejorada en ayunas.	

5 Los presentes inventores han encontrado que el nivel de fragmentos solubles del receptor de adiponectina en fluido corporales es un indicador de síndrome metabólico en un sujeto. Por lo tanto, el presente método puede ser utilizado para identificar sujetos que tienen síndrome metabólico. Estos métodos pueden ser usados en combinación con cualquiera de los otros criterios de diagnóstico para identificación del síndrome metabólico.

10 Por ejemplo, con el propósito de determinar si un sujeto tiene síndrome metabólico, se pueden determinar los niveles de los fragmentos descritos en la presente invención. En ciertas realizaciones, la ausencia o la presencia de menores niveles de ciertos fragmentos, es decir, fragmentos que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 1, 2, 4 - 11, 23, 24, y/o 26 - 33), y que están generalmente no enlazados será indicativa de una mayor probabilidad de tener síndrome metabólico. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un estado normal. En ciertas realizaciones, la presencia de mayores cantidades de ciertos fragmentos más pequeños, es decir, fragmentos que tienen de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, la SEQ ID NOs: 3, 12 - 22, 25, y/o 34 - 44) será indicativa de una mayor probabilidad de tener síndrome metabólico. Un incremento en la concentración total de fragmentos del receptor de adiponectina, enlazados o no enlazados a la proteína portadora, es decir, adiponectina, es generalmente indicativa de una mayor probabilidad de tener síndrome metabólico.

20 Los síndromes coronarios agudos (ACS) han sido aplicados a un grupo de trastornos coronarios que resulta de una lesión isquémica del corazón. El síndrome coronario agudo se define como una obstrucción vascular superior al 60% por medio de una evaluación angiográfica con o sin una condición cardíaca.

Los presentes inventores han encontrado que el nivel de fragmentos solubles del receptor de adiponectina en fluido corporal es un indicador de obstrucción vascular en un sujeto. Por consiguiente, el presente método se puede utilizar para identificar sujetos que tienen una obstrucción vascular. Estos métodos se pueden utilizar en combinación con cualquiera de los otros criterios de diagnóstico para identificar obstrucciones vasculares.

25 Por ejemplo, con el fin de determinar si un sujeto tiene una obstrucción vascular, se pueden determinar los niveles del fragmento descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, la ausencia o la presencia de disminución de los niveles de ciertos fragmentos, es decir, fragmentos que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 1, 2, 4 - 11, 23, 24 y / o 26 - 33), y que por lo general no están enlazados será indicativa de una mayor probabilidad de tener obstrucción vascular. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un estado normal. En ciertas realizaciones, la presencia de mayores cantidades de ciertos fragmentos más pequeños, es decir, fragmentos que tienen de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 3, 12 - 22, 25 y / o 34 - 44) será indicativa de un aumento de la probabilidad de tener obstrucción

vascular. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un estado normal. Un aumento en la concentración total de fragmentos del receptor de adiponectina enlazados o no enlazados a la proteína portadora, es decir, la adiponectina, es generalmente indicativo de un aumento de la probabilidad de tener una obstrucción vascular.

5 Una condición cardíaca, también conocida como una condición de enfermedad cardiovascular, generalmente significa una enfermedad que resulta a partir de una insuficiencia cardiovascular, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad cardíaca coronaria (que incluye, además, infarto de miocardio y angina de pecho) o enfermedad de la

10 arteria coronaria, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congénita e insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca congénita, y presión arterial alta. La enfermedad coronaria también incluye infarto de miocardio y angina de pecho. Las enfermedades cardiovasculares se caracterizan generalmente por un suministro deteriorado de la sangre al corazón u otros órganos objetivo. "Insuficiencia cardíaca" se refiere a una anomalía de la función cardíaca en la que el corazón no bombea sangre a la velocidad necesaria para cumplir con los requisitos de la metabolización de los tejidos. La insuficiencia cardíaca puede ser causada por una cantidad de factores, incluyendo las formas isquémica, congénita, reumática o idiopática.

15 La enfermedad cardíaca coronaria (CHD) es causada por un engrosamiento de las paredes interiores de las arterias coronarias. Este engrosamiento, llamado aterosclerosis, estrecha el espacio a través del cual la sangre puede fluir, disminuyendo y a veces cortando completamente el suministro de oxígeno y nutrientes al corazón. La aterosclerosis ocurre generalmente cuando una persona tiene altos niveles de colesterol en la sangre. El colesterol y la grasa, que circula en la sangre, se acumulan en las paredes de las arterias. La acumulación estrecha las arterias y puede

20 ralentizar o bloquear el flujo de sangre. Cuando el nivel de colesterol en la sangre es alto, hay una mayor posibilidad de que se deposite sobre las paredes de las arterias. Este proceso se inicia en la mayoría de las personas durante la infancia y la adolescencia, y empeora a medida que envejecen.

La insuficiencia cardíaca congestiva o (CHF) es un estado patológico progresivo donde el corazón es cada vez más incapaz de suministrar un volumen cardíaco adecuado (el volumen de sangre bombeada por el corazón en el

25 tiempo) para suministrar la sangre oxigenada a los tejidos periféricos. A medida que avanza la CHF, se producen daños estructurales y hemodinámicos. Aunque estos daños tienen una variedad de manifestaciones, un síntoma característico es la hipertrofia ventricular. La CHF es un resultado final común de una cantidad de diversos trastornos cardíacos.

El infarto de miocardio generalmente está provocado por aterosclerosis de las arterias coronarias, a menudo con

30 trombosis coronaria superpuesta. Puede dividirse en dos tipos principales: infartos transmurales, en los que la necrosis miocárdica implica el engrosamiento completo de la pared ventricular, y los infartos subendocárdicos (no transmurales), en el que la necrosis implica el subendocardio, el miocardio intramural, o ambos, sin extenderse a través de toda la pared ventricular hacia el epicardio. Se sabe que el infarto de miocardio causa tanto un cambio en los efectos hemodinámicos como una alteración en la estructura en las zonas dañadas y sanas del corazón. Así, por

35 ejemplo, el infarto de miocardio reduce el volumen cardíaco máximo y el volumen sistólico del corazón. También asociado con el infarto de miocardio está una estimulación de la síntesis de ADN que se presenta en el intersticio así como un aumento en la formación de colágeno en las áreas del corazón no afectadas.

La angina de pecho ("angina") es un dolor o molestia recurrente en el pecho que se produce cuando alguna parte del

40 corazón no recibe suficiente sangre. Es un síntoma común de la enfermedad cardíaca coronaria (CHD), que se produce cuando los vasos que llevan la sangre al corazón se estrechan y se obstruyen debido a la aterosclerosis.

El diagnóstico y el control de todas estas enfermedades por parte de los presentes métodos están abarcados en la presente invención.

Por ejemplo, los presentes inventores han encontrado que el nivel de fragmentos solubles del receptor de

45 adiponectina en fluido corporal es un indicador de si un sujeto, particularmente un sujeto que ya sufre de arteriosclerosis, es probable que desarrolle o tenga insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, o isquemia. Por consiguiente, el presente método puede ser utilizado para identificar sujetos que tienen insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, o isquemia. Estos métodos se pueden utilizar en combinación con cualquiera de los otros criterios de diagnóstico para la identificación de estas condiciones.

Por ejemplo, con el fin de determinar si un sujeto tiene o es propenso a desarrollar insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, o isquemia, se pueden determinar los niveles de los fragmentos descritos en el presente

50 documento. En ciertas realizaciones, la ausencia o presencia de menores niveles de ciertos fragmentos, es decir, fragmentos que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 1, 2, 4 - 11, 23, 24 y / o 26 - 33), y que generalmente no están enlazados es indicativa de un aumento de la probabilidad de tener insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, o isquemia. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos

55 fragmentos será indicativa de un estado normal. En ciertas realizaciones, la presencia de mayores cantidades de ciertos fragmentos más pequeños, es decir, fragmentos no enlazados que tienen de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 3, 12 - 22, 25 y / o 34 - 44) será indicativa de una mayor probabilidad de tener

insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, o isquemia. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un estado normal. Un aumento de la concentración total de fragmentos del receptor de adiponectina no enlazados o enlazados a la proteína portadora, es decir, la adiponectina, generalmente es indicativo de un aumento de la probabilidad de tener insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, o isquemia.

De manera similar, los presentes métodos se pueden utilizar para identificar sujetos que tienen hipertensión, obesidad, lipidemia, o inflamación. Estos métodos se pueden utilizar en combinación con cualquiera de los otros criterios de diagnóstico para identificar estas condiciones. En todas estas condiciones, en ciertas realizaciones, la ausencia o la presencia de menores niveles de ciertos fragmentos, es decir, fragmentos que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOS: 1, 2, 4 - 11, 23, 24 y / o 26 - 33), y que generalmente no están enlazados es indicativa de una mayor probabilidad de tener la enfermedad. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un estado normal. En ciertas realizaciones, la presencia de una mayor cantidad de ciertos fragmentos más pequeños, es decir, de fragmentos no enlazados que tienen de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOS: 3, 12 - 22, 24 y / o 34 - 44) es indicativa de que se tiene la condición. Por el contrario, la presencia de niveles normales de estos fragmentos será indicativa de un estado normal. Un aumento en la concentración total de fragmentos del receptor de adiponectina no enlazados o enlazados a la proteína portadora, es decir, adiponectina, generalmente es indicativo de un mayor probabilidad de tener la enfermedad.

La presente invención proporciona métodos de diagnóstico y de pronóstico mediante el uso de la medición específica de al menos un fragmento descrito en el presente documento. Los métodos implican primero proporcionar una medición del fragmento del receptor de adiponectina y luego correlacionar la medición con un estado de enfermedad. Mediante la correlación de la medición, uno es capaz de calificar el estado del sujeto con respecto al parámetro clínico particular en cuestión. En una realización preferida, la medición se hace mediante espectrometría de masas de afinidad como se discutió anteriormente.

El poder de una prueba de diagnóstico para predecir correctamente el estado se mide comúnmente como la sensibilidad del ensayo, la especificidad de la prueba o el área bajo una curva característica operada por el receptor ("ROC"). La sensibilidad es el porcentaje de verdaderos positivos que son predichos por una prueba como positivos, mientras que la especificidad es el porcentaje de verdaderos negativos que son predichos por una prueba como negativos. Una curva ROC proporciona la sensibilidad de una prueba como una función de 1 - la especificidad. Entre mayor es el área bajo la curva ROC, más poderoso el valor predictivo de la prueba. Otras medidas útiles de la utilidad de una prueba son el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo. El valor predictivo positivo es el porcentaje de positivos reales que se consideran como positivos. El valor predictivo negativo es el porcentaje de negativos reales que se consideran como negativos.

Estos fragmentos descritos en el presente documento, de forma individual, o, en combinación, son útiles para ayudar en la determinación de un estado de la enfermedad. En ciertas formas de realización, primero, se mide el biomarcador seleccionado, es decir, un fragmento en particular, en una muestra del sujeto usando los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, captura en un biochip SELDI seguido por la detección por medio de espectrometría de masas. Entonces, la medición se compara con una cantidad de diagnóstico o de corte que distingue a un parámetro de diagnóstico de otro, por ejemplo, un parámetro positivo de resistencia a la insulina de un parámetro negativo de resistencia a la insulina. La cantidad de diagnóstico representa una cantidad medida de un biomarcador por encima de la cual o por debajo de la cual un sujeto se clasifica como que tiene una enfermedad particular. Por ejemplo, si el fragmento está sobreexpresado en comparación con uno normal en el estado de enfermedad, entonces, una medida cantidad por encima del punto de corte diagnóstico proporciona un diagnóstico de la enfermedad. Alternativamente, si el biomarcador está subexpresado en la enfermedad, entonces, una cantidad medida por debajo del punto de corte de diagnóstico proporciona un diagnóstico de la enfermedad. Como es bien entendido en la técnica, mediante el ajuste del punto de corte de diagnóstico particular usado en un ensayo se puede aumentar la sensibilidad o la especificidad del ensayo de diagnóstico dependiendo de la preferencia de la persona que realiza el diagnóstico.

En algunas realizaciones, la mera presencia o ausencia de un fragmento en particular, sin cuantificar la cantidad del fragmento, es útil y se puede correlacionar con un diagnóstico probable de la enfermedad, es decir, resistencia a la insulina. Por lo tanto, una presencia o ausencia detectada, respectivamente, de estos marcadores en un sujeto puede indicar que el sujeto tiene un mayor probabilidad de tener resistencia a la insulina.

En ciertas realizaciones de los métodos de calificación del estado de enfermedad, los métodos comprenden además el manejo del tratamiento del sujeto en función de su estado. Este manejo describe las acciones del médico o del clínico tratante después de determinar el estado de la enfermedad. Por ejemplo, si un médico hace un diagnóstico de la enfermedad, viene luego un cierto régimen de tratamiento. Por ejemplo, para muchas personas, la enfermedad cardíaca cardiovascular se maneja con cambios en el estilo de vida y con medicamentos. Otros con enfermedad cardíaca cardiovascular severa pueden necesitar cirugía. En cualquier caso, una vez que se desarrolla una enfermedad cardiovascular, se requiere de un manejo para toda la vida. Alternativamente, un diagnóstico de estado

de la enfermedad cardíaca no coronaria o otro estado de enfermedad cardiovascular podría ser seguido por ningún tratamiento. Si la prueba de diagnóstico no entrega resultados concluyentes en el sentido de reconocer una enfermedad coronaria, se puede requerir de otras pruebas.

Aunque los biomarcadores individuales son marcadores de diagnóstico útiles, se ha encontrado que una combinación de biomarcadores puede proporcionar un mayor valor predictivo de un estatuto particular que los marcadores individuales por sí solos. Específicamente, la detección de una pluralidad de marcadores en una muestra puede aumentar el porcentaje de diagnósticos positivos verdaderos y diagnósticos negativos verdaderos y disminuye el porcentaje de diagnósticos positivos falsos o negativos falsos. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los presentes métodos implican la detección de una pluralidad de los fragmentos descritos en el presente documento.

Por consiguiente, en un aspecto, esta invención proporciona un método para el descubrimiento de patrones de fragmentos del receptor de adiponectina, los cuales se correlacionan con un parámetro clínico de interés.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para la medición de la respuesta a la terapia que comprende las etapas de proporcionar una primera muestra biológica, preferiblemente una muestra de orina y / o una muestra de plasma sanguíneo, la medición de la cantidad de al menos un fragmento soluble del receptor de adiponectina en la primera muestra biológica en un primer momento, proporcionar una segunda muestra biológica del paciente, midiendo el fragmento en la segunda muestra biológica en un segundo momento, y la determinación de la respuesta en el paciente con base en el cambio en la cantidad del fragmento o con base en una comparación con una población de control. El sujeto puede ser alguien que responde en forma positiva, alguien que responde en forma pobre o alguien que no responde. Para el uso en el presente documento, alguien que responde en forma positiva, es un sujeto que responde positivamente al tratamiento, es decir, un sujeto que experimenta un éxito en la mejoría de la condición, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como alivio; remisión; disminución de síntomas o que hace la condición más tolerable para el paciente; desaceleración en la velocidad de degeneración o declinación; haciendo el momento final de la degeneración menos debilitante; o que mejora el bienestar físico o mental de un sujeto. Alguien que responde en forma positiva es aquel en el que cualquier efecto secundario tóxico o perjudicial del agente biológicamente activo se ve compensado en términos clínicos por los efectos terapéuticamente benéficos. Alguien que no responde es un sujeto que no responde al tratamiento o no responde a un nivel satisfactorio. Alguien que responde en forma pobre es un sujeto que responde al tratamiento, pero no al mismo nivel de alguien que responde en forma positiva.

En ciertas realizaciones en las que el estado de enfermedad es resistencia a la insulina u otra condición relacionada con resistencia a la insulina tal como diabetes o síndrome metabólico, el tratamiento terapéutico generalmente comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de uno o más compuestos farmacéuticos sensibilizadores a la insulina. Los compuestos farmacéuticos sensibilizadores a la insulina son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, agonistas de PPAR tales como una tiazolidindiona (también conocida como una TZD); o agonistas parciales de PPAR gamma, también conocidos como moduladores selectivos de PPAR gamma (de SPPARM), agonistas parciales duales de PPAR alfa - gamma (moduladores selectivos duales de PPAR alfa- gamma selectiva) y pan-agonistas de PPAR. Los agonistas de PPAR gamma que tienen una estructura de TZD incluyen pioglitazona, rosiglitazona, ciglitazona, darglitazona, englitazona, balaglitazona, isaglitazona, troglitazona, netoglitazona, MCC-555, y BRL - 49653. Otros agonistas de PPAR gamma, algunos de los cuales tienen una estructura de TZD, incluyen CLX - 0921, 5 - BTZD, GW - 0207, LG - 100641, LY - 300512, NN - 2344, LY 818, GW - 677954, GW - 7282 y T - 131. Los agonistas duales de PPAR alfa / gamma que exhiben tanto agonismo alfa como gamma y pueden ser utilizados para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y para reducir los lípidos. Los agonistas de PPAR alfa / gamma incluyen KRP - 297 (MK - 0767), muraglitazar (BMS - 298585), farglitazar, ragaglitazar (AZ - 242), JT - 501, GW - 2570, GI - 262579, CLX - 0940, GW - 1536, GW1929, GW 2433, L - 796449, LR - 90, SB - 219994, LY - 578, LY - 4655608, LSN - 862, LY - 510929, y LY - 929.

Los métodos descritos aquí pueden ser utilizados para determinar si es probable que un paciente sea alguien que responde al tratamiento con cualquier medicamento usado para tratar la diabetes tipo 2 o la resistencia a la insulina, incluyendo, por ejemplo, una biguanida (por ejemplo, metformina); una sulfonilurea; otra clase de compuestos químicos de secretagogo de insulina que no sea una sulfonilurea, tal como una meglitinida; insulina (que se puede formular para inyección subcutánea o intramuscular, o en una formulación para evitar la necesidad de la inyección, tal como oral, bucal, o nasal); un inhibidor de DP - IV; un inhibidor de PTP - 1B; un análogo de GLP - 1; un inhibidor de glucógeno fosforilasa; un antagonista del receptor de glucagón; un inhibidor de hidroxisterol deshidrogenasa (HSD - 1); un activador de la glucoquinasa; o un agonista de PPAR gamma de TZD o que no es de TZD, o cualquier combinación de tratamiento de los mismos.

Los métodos descritos aquí pueden ser utilizados para determinar si un paciente es probable que sea alguien que responde al tratamiento con cualquier fármaco que puede ser utilizado para tratar la obesidad en un paciente obeso que también tiene diabetes tipo 2 o resistencia a la insulina, incluyendo, por ejemplo, ibutramina, orlistat, fentermina, un agonista de Mc4r I, un antagonista / agonista inverso del receptor canabinoide 1 (CB - 1), un agonista 33 adrenérgico; o un agonista de PPAR gamma de TZD o que no es de TZD, o cualquier combinación de tratamiento

de los mismos.

Los métodos descritos aquí pueden ser utilizados para determinar si un paciente es alguien que responde al tratamiento con cualquier medicamento usado para reducir el colesterol total o LDL - colesterol y / o elevar el HDL - colesterol, incluyendo, por ejemplo, un Inhibidor de la HMG- CoA reductasa (lovastatina, simvastatina, rosuvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rivastatina, pitavastatina, ZD - 4522, y otro declarado); niacina; un inhibidor de la absorción de colesterol (ezetimiba); un inhibidor de CETP (torcetrapib); un agonista de PPAR alfa (fenofibrato, gemfibrozil, clofibrato, o bezafibrato); un inhibidor de ACAT (avasimiba); un antioxidante (probuco); o un secuestrante de ácidos biliares (colestiramina), o un agonista de PPAR gamma de TZD o que no es TZD, o cualquier combinación de tratamiento de los mismos.

- 10 En ciertas realizaciones, el nivel de fragmentos del receptor de adiponectina se determina antes del inicio del tratamiento y luego, después de que se ha realizado el tratamiento durante un tiempo suficiente largo para que los cambios en el nivel o los patrones de los fragmentos reflejen si el paciente responderá al tratamiento. Después de efectuado el tratamiento, un paciente que es alguien que probablemente responda a la terapia tiene mayores niveles de ciertos fragmentos, es decir, fragmentos que tienen de 25 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID
- 15 NOs: 1, 2, 4 - 11, 23, 24, y / o 26 - 33) y que generalmente no están enlazados, y menores cantidades de ciertas fragmentos más pequeños, es decir, fragmentos que tienen de 13 a 24 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 3, 12 - 22, 24, y / o 34 - 44). En ciertas realizaciones, se observarán las diferencias dentro de las cuatro semanas después de que comience el tratamiento, de preferencia dentro de dos semanas después del inicio del tratamiento, y lo más preferiblemente dentro de una semana después de que comience el tratamiento.

20 VI. Biomarcadores adicionales

- En ciertas realizaciones, se combina la evaluación de uno o más marcadores adicionales para aumentar el valor predictivo del análisis en comparación con aquel obtenido a partir de la medición solo de fragmentos del receptor de adiponectina. Por ejemplo, se pueden medir uno o más marcadores para el estado de la enfermedad, es decir, el
- 25 desequilibrio de adipocitos, la resistencia a la insulina, la diabetes, el síndrome metabólico, el síndrome coronario agudo (es decir, obstrucción vascular), enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, cardiopatía congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio, isquemia, aterosclerosis, obesidad, lipidemia, o inflamación, junto con fragmentos del receptor de adiponectina para mejorar el valor predictivo de los métodos descritos. Los biomarcadores que pueden ser utilizados en combinación con los presentes métodos incluyen, por ejemplo, factores de adipocitos, por ejemplo, adiponectina, leptina, visfatina, Klotho,
- 30 péptido 1 similar al glucagón (GLP- 1), DDPIV, resistina, grelina, proteína quinasa activada por AMP (AMPK), Sirt1, agonistas de PPAR, ARNT (translocador nuclear del receptor del hidrocarburo arilo), HIF1B, péptido C, Foxa2, insulina, o glucosa, incluyendo fragmentos, péptidos y variantes de los mismos y / o marcadores de inflamación, por ejemplo, RBF- 4, proteína reactiva C (CRP), resistina, MCP-1, IL-6, TNF- α , IL-1 beta, PAI - 1, bikunina, factores autoinmunes, autoanticuerpos para ácido glutámico, autoanticuerpos de células de los islotes, autoanticuerpos de
- 35 insulina, autoanticuerpos para IL - 2, autoanticuerpos para IA-2, incretinas, y otros factores autoinmunes y fragmentos, péptidos o variantes de los mismos.

Los métodos descritos aquí se pueden utilizar en combinación con cualquier otra prueba que ayude en el diagnóstico de una enfermedad, la determinación del avance de una enfermedad, o determinación de la eficacia del tratamiento de una enfermedad.

- 40 En ciertas realizaciones, también se medirán los niveles de adiponectina en el sujeto. Los métodos para medir la adiponectina y correlacionar los niveles de adiponectina con estados de enfermedad son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.461.821, las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 20050054005 y 20050048565 y las publicaciones internacionales Nos. WO2004086040, WO2005046734, WO2005038457 y WO2004022596. Para uso en el presente documento, el término adiponectina
- 45 incluye variantes del mismo que tienen actividad de adiponectina. En ciertas realizaciones, la cantidad de adiponectina total, la cantidad de adiponectina de bajo peso molecular, la cantidad de adiponectina de alto peso molecular o la relación entre estos números se utilizará en combinación con los métodos de la presente invención. Por lo tanto, los presentes métodos pueden incluir la etapa de medir el nivel de adiponectina (adiponectina total, adiponectina de alto peso molecular, adiponectina de bajo peso molecular, u otras formas de adiponectina,
- 50 incluyendo fragmentos y variantes de las mismas) en una muestra biológica de un sujeto y correlacionar la cantidad con la presencia de un estado de enfermedad, con el avance de la enfermedad, o la eficacia del tratamiento. Cantidades reducidas de adiponectina son indicativas de una enfermedad, así como una proporción más pequeña de adiponectina de alto peso molecular con respecto a adiponectina total o de bajo peso molecular.

- 55 En ciertas realizaciones, se medirán los niveles de leptina en el sujeto. Los métodos para la medición de la leptina, incluyendo variantes de la misma, y la correlación de los niveles de leptina con estados de enfermedad son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Gorden y Gavrilo, Current Opinion in Pharmacology, (2003) 3: 655 - 659.

En ciertas realizaciones, los niveles de péptido natriurético en el cerebro (BNP) se pueden medir para ayudar en el diagnóstico o el avance de la obstrucción vascular y la enfermedad cardiovascular. Los métodos para medir los niveles de BNP y su correlación con estados de enfermedad son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Frank Peacock, *Cleveland Clinic Journal of Medicine* (2002), 69 (3) 243 - 251.

- 5 Los presentes métodos se pueden utilizar para identificar sujetos que tienen inflamación y ciertas enfermedades caracterizadas por la inflamación excesiva. Estos métodos se pueden utilizar en combinación con métodos conocidos para la determinación de los niveles de inflamación en un sujeto.

10 En ciertas realizaciones, se medirán los niveles de bikunina y / o uristatina en el sujeto. La bikunina representa la cadena ligera inhibidora de la proteína inhibidora de inter- α -tripsina. Es una inhibidora de la proteasa, conocida por ser elevada en la orina de los pacientes con enfermedades inflamatorias y se considera una proteína de fase aguda. Para su uso en la presente invención, el término bikunina incluye variantes de la misma que tienen actividad de bikunina. La uristatina es un inhibidor de tripsina presente en la orina que se incrementa en la mayoría de los

15 pacientes con infecciones bacterianas o virales y en muchos con trastornos inflamatorios. Los métodos para medir la bikunina o la uristatina, incluyendo variantes de las mismas, y correlacionar los niveles de bikunina o uristatina con estados de enfermedad son conocidos en la técnica. La uristatina es un inhibidor de tripsina presente en la orina que se incrementa en la mayoría de los pacientes con infecciones bacterianas o virales y en muchos con trastornos inflamatorios. (Pugia y Lott, *Clin. Chem. Lab Med* 2005 43 (1): 1 - 16, publicación internacional número WO200504022.

20 En ciertas realizaciones, se medirán en el sujeto los niveles de proteína reactiva C. Los métodos para medir la proteína reactiva C, incluyendo las variantes de la misma, y la correlación de los niveles de proteína reactiva C con estados de enfermedad son conocidos en el arte. Por ejemplo la proteína reactiva C presente en el suero sanguíneo durante episodios de inflamación o infección aguda. Los niveles de CRP de aproximadamente 1 mg / dL son usualmente considerados altos para la CRP y la mayoría de las infecciones e inflamaciones resultan en niveles de CRP por encima de 10 mg / dL. Para uso en el presente documento el término proteína reactiva C incluye variantes

25 de la misma que tienen actividad de proteína reactiva C. (Pugia y Lott, *Clin. Chem. Lab Med*, 2005, 43 (1): 1 - 16).

En ciertas realizaciones, se puede llevar a cabo un recuento de glóbulos blancos en combinación con los métodos descritos en el presente documento. Los métodos para la medición de glóbulos blancos y la correlación de los niveles de glóbulos blancos con estados de enfermedad son conocidos en el arte. El recuento de glóbulos blancos (WBC), o la medición de los glóbulos blancos en la sangre, es un marcador confiable y ampliamente utilizado que

30 refleja la inflamación en todo el cuerpo. El recuento WBC también está relacionado con otras condiciones crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes.

En ciertas realizaciones, se harán mediciones de glucosa en ayunas, de tolerancia a la glucosa, y / o de insulina y los niveles de péptido C estimulados por glucagón en el sujeto. Los métodos de medición de la insulina y del péptido C, incluyendo variantes de los mismos, y la correlación de los niveles de insulina y de péptido C con estados de enfermedad son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han reportado los niveles de péptido C estimulados por glucagón mayores aproximadamente a 1,8 ng / mL para identificar a los diabéticos tipo 2 que podrían ser manejados sin tratamiento con insulina. Típicamente, se usan 3,0 ng / mL como límite superior indicativo de la hiperinsulinemia o de resistencia a la insulina. En contraste, niveles aproximadamente menores a 0,5 ng / mL según los informes

35 identifican pacientes tipo 1 que requieren tratamiento con insulina debido a la hipoinsulinemia. El rango normal de referencia para adultos normales es de 0,5 - 2 ng / mL.

40

En realizaciones en las que se usan uno o más marcadores en combinación con fragmentos del receptor de adiponectina para aumentar el valor predictivo del análisis, se puede medir el nivel de los marcadores adicionales en la misma muestra biológica del sujeto o en otro, que puede ser del mismo tipo o de un tipo diferente. Por ejemplo, se puede medir el nivel de fragmentos del receptor de adiponectina en una muestra de plasma sanguíneo, mientras que

45 el nivel de un marcador adicional, se puede medir en la misma muestra de plasma, una muestra diferente de plasma, o en una muestra de suero o de orina del sujeto.

VII. Estados de enfermedad adicionales

La adiponectina está involucrada en muchos procesos y rutas en el organismo. En consecuencia, la detección del patrón de fragmentación de fragmentos del receptor de adiponectina se puede utilizar para determinar el inicio,

50 controlar el avance y / o determinar la eficacia del tratamiento farmacológico para muchos estados de enfermedad. En particular, la detección de fragmentos solubles del receptor de adiponectina se puede utilizar en combinación con otros métodos y herramientas de diagnóstico para determinar el inicio, controlar el avance y / o determinar la eficacia del tratamiento farmacológico para muchos estados de enfermedad. En particular, la detección de fragmentos solubles del receptor de adiponectina se puede asociar con transformación de células angiogénicas, aterogénicas, y

55 de macrófagos. El receptor 1 de adiponectina está sobrerregulado por el enlazamiento con receptores nucleares LXR que son activados por ácidos grasos y receptores LXR son parte integral de la transformación de macrófagos. También se ha mostrado que se incrementa la expresión del receptor 1 de adiponectina durante la transformación

de los monocitos.

En consecuencia, las enfermedades inflamatorias, es decir, las enfermedades activadas por mediadores celulares o no celulares del sistema inmunológico o de tejidos que causan la inflamación de los tejidos del cuerpo y posteriormente producen una condición inflamatoria aguda o crónica, pueden ser detectadas y controladas por medio de los presentes métodos. Los ejemplos de tales enfermedades, incluyen, por ejemplo, hipersensibilidad de tipo I - IV, por ejemplo, enfermedad de hipersensibilidad del pulmón incluyendo asma, enfermedades atópicas, rinitis alérgica o conjuntivitis, angioedema de los párpados, agioedema hereditario, reacciones de hipersensibilidad del antirreceptor y enfermedades autoinmunes, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, pénfigo, miastenia grave, enfermedad de Grave y de Raynaud, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, escleroderma, enfermedad del tejido conectivo mixta, polimiositis, sarcoidosis, infección del tracto urinario, nefropatía por IgA, glomerulonefritis, reacciones de injerto huésped agudas y crónicas.

Los cánceres también pueden ser detectados y se les puede hacer seguimiento usando los presentes métodos. El cáncer se refiere a cualquiera entre una cantidad de enfermedades que se caracterizan por la proliferación incontrolada, anormal de las células, la capacidad de las células afectadas para propagarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo (es decir, metástasis), así como cualquiera de una serie de características estructurales y / o rasgos moleculares. El término cáncer incluye, pero no se limita a, cánceres de los órganos reproductivos femeninos que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de ovario, cáncer cervical y cáncer de útero; cáncer de pulmón; cáncer de mama; carcinoma de células renales; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; cánceres del sistema genitourinario incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, y cáncer de la uretra; cánceres de cabeza y cuello; cáncer de hígado; cánceres del sistema gastrointestinal incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de estómago, cáncer de esófago; cáncer de intestino delgado o cáncer de colon; cánceres del árbol biliar; cáncer de páncreas; cánceres del sistema reproductivo masculino, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de testículo; enfermedad trofoblástica gestacional; cánceres del sistema endocrino incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de tiroides, cáncer paratiroideo, cáncer de la glándula suprarrenal, tumores carcinoides, insulinosomas y tumores PNET; sarcomas, incluyendo pero sin limitarse a, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, liposarcoma, leiomiomasarcoma y rabdomiosarcoma; mesoteliomas; cánceres de la piel, melanomas, cánceres del sistema nervioso central; cánceres pediátricos, y cánceres del sistema hematopoyético, incluyendo, pero sin limitarse a, todas las formas de leucemia, síndromes mielodisplásicos, trastornos mieloproliferativos y mieloma múltiple.

VIII. Kits

Para el uso en las aplicaciones descritas o sugeridas anteriormente, también se suministran kits por parte de la invención. Tales kits pueden, por ejemplo, incluir un medio portador que está compartimentalizado para recibir en confinamiento cerrado uno o más medios contenedores tales como tiras, casetes, chips de microfluidos, viales, tubos, y similares, comprendiendo cada uno de los medios contenedores uno de los elementos separados para ser usados en el método. Por ejemplo, uno de los medios contenedores puede comprender una sonda que es o puede ser marcada de forma detectable. Dicha sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para un fragmento soluble del receptor del terminal C.

Además, los kits pueden incluir materiales informativos que contienen instrucciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención. Aunque los materiales informativos comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a ellos. Cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlás a un usuario final está contemplado por esta invención. Tales medios incluyen, pero no se limitan a medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips, y similares), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Tales medios pueden incluir direcciones para sitios en Internet que ofrecen este tipo de materiales con instrucciones.

El kit también puede comprender, por ejemplo, un medio para obtener una muestra biológica de un individuo. Los medios para la obtención de muestras biológicas de individuos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, catéteres, jeringas, y similares, y no se discuten en este documento en detalle.

Las siguientes realizaciones a modo de ejemplo de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención se ofrecen para fines ilustrativos solamente, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Detección de fragmentos del terminal C en individuos diabéticos

Ciento dieciséis pacientes fueron evaluados por sus antecedentes médicos. Cincuenta no tenían antecedentes de diabetes o factores de riesgo metabólicos (lípidos, hipertensión, obesidad) no fueron diagnosticados con síndrome

metabólico de acuerdo con la definición de la OMS. Sesenta y nueve tenían antecedentes de diabetes tipo 1 o tipo 2. Se evaluó adicionalmente la resistencia a la insulina en todos los pacientes por medio de la medición de la glucosa, el péptido C y la hemoglobina A1c.

- 5 La adiponectina, el péptido C, la insulina, y la adiponectina HMW se midieron usando un kit comercial de ELISA. Se midió HbA1c con el instrumento DCA 2000+ (Bayer) y la glucosa por medio del YSI. Se utilizó el siguiente ensayo ELISA para AdipoRI para medir todos los fragmentos del terminal C ya sea enlazados o no enlazados.

- 10 Los materiales para el ensayo de ELISA del fragmento AdipoRI del terminal C incluyen placas de microtitulación (Costar PN 3690, alto enlazamiento), solución salina amortiguada con Tris (TBS) (Pierce, número de producto 28376), péptido del receptor 1 de adiponectina (AdipoR1) (péptidos 16 - 34) (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., número de producto 001-44), Súper Bloque en TBS (Pierce, número de producto 37535), TBS / TW - solución salina amortiguadora Tris que contiene 0,05 % de Tween 20 (Tween 20 - Pierce, número de producto - P8341), anticuerpo anti - AdipoRI de conejo (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., número de producto G-001-44), IgG anticonejo de Cabra - ALP (Sigma número de producto A 3687), PNPP de 1 etapa (Pierce, número de producto 37621) y NaOH 2 N.

- 15 Los reactivos se prepararon de la siguiente manera. Se preparó una solución madre del péptido AdipoRI (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., número de producto 001-44) disolviendo 100 µg de péptido en 100 µL de acetonitrilo al 60% que contiene 0,1 % de TFA como se indica. Esta solución de 1,0 mg / mL se diluyó adicionalmente hasta 10 ml con agua nanopura hasta obtener una solución madre de 10 µg / mL. Esta solución se dividió en alícuotas de 500 µl por vial que se almacenan congeladas a - 70 °C. Se utilizaron 0,10 µg / mL en TBS de péptido AdipoRI para recubrir placas de capa y se prepararon añadiendo 100 µL de péptido AdipoRI en una concentración de 10 µg / mL en TBS (A más arriba) a 9900 µL de TBS y mezclando bien. Se preparó una solución madre de anti-AdipoR1 de conejo (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., número de producto G -001-44) disolviendo anticuerpo 200uG en 200 µL de agua nanopura como se indica. Esto hace una solución de anticuerpo de 1,0 mg / mL. Se forman alícuotas de 50 µL y se almacenan congeladas a -70 °C. Se elabora una solución de 6,0 µg / mL de anti-AdipoR1 de conejo en el Súper Bloqueador mediante la adición de 18,0 µL de anti-AdipoRI madre en 2982 µL del Súper Bloqueador y se mezcla bien. Se elaboró una solución de 3,75 µg / mL de anti-AdipoRI de conejo en el Súper Bloqueador (utilizado para diluir las muestras de plasma 5 veces; cambio de concentración para otras diluciones) añadiendo 56,25 µL de anti-AdipoRI madre (C) a 15.000 µL de Súper Bloqueador y mezclando bien. Se hizo una dilución de 1/2000 de IgG anti-conejo de cabra - ALP mediante la adición de 7,5 µL de IgG anti-conejo de cabra - ALP (Sigma, número de producto A 3687) en 15,0 mL de Súper Bloqueador y se mezcla bien.

- 30 La preparación de los calibradores se hizo utilizando péptido AdipoR1 en Súper Bloqueador que contenía 3,0 µg/mL de anti-AdipoRI de conejo para alcanzar concentraciones de péptido AdipoRI de 5,0; 2,5; 1,25; 6,25; 0,312; 0,156; 0,078 y 0 µg / mL.

- 35 El método para el ensayo por ELISA de AdipoRI se llevó a cabo mediante el recubrimiento de la placa de microtitulación con 50 µL / pozo de 0,10 µg / mL de péptido AdipoR1 en TBS, y se almacena a 4 °C por un mínimo de 72 horas, removiendo la placa de microtitulación recubierta del refrigerador, y desocupando la placa y lavando las 3 veces con 200 µL / pozo de TBS. Esto fue seguido por la adición de 150 µL de amortiguador Súper Bloqueador (Pierce PN 37535) a cada pozo y agitando la placa durante 30 minutos a 25 °C. La placa se vacía y se lava 5 veces con TBS / TW. Esto es seguido por la adición de los calibradores preparados que contienen 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78, y 0 ng / ml de péptido AdipoRI o de muestras diluidas 5 veces con amortiguador bloqueador. Todas las muestras y calibradores contenían 3,0 µg/mL de anti-AdipoRI de conejo. Las muestras o calibradores se añadieron como 50 µL / pozo y se incubaron durante la noche a 5 °C en un refrigerador. Esto fue seguido por el vaciado de la placa y el lavado 5 veces con TBS / TW.

- 45 Se añadió la dilución 1/2000, de IgG anti-conejo de cabra - ALP en el Súper Bloqueador a 50 µL / pozo a todos los pozos de la plantilla de ELISA. Esto se incubó durante 2 horas a 25 °C en el agitador Jitterbug en la posición # 2. La placa fue vaciada y lavada las 5 veces con TBS / TW. Se añadieron 50 µL de PNPP de 1 etapa (Pierce PN 37621) a cada pozo. Se incubó la placa durante 30 min a 25 °C en el agitador Jitterbug. Se añadieron 25 µl de NaOH 2 N a cada pozo para detener la enzima de reacción. La placa se dejó en reposo por lo menos 5 min antes de leer a 405 nm. Se hizo un ajuste de los datos del calibrador con una curva estándar y se calcularon las incógnitas (un decaimiento exponencial de una sola fase suele dar un mejor ajuste) para calcular los valores en la muestra.

- 50 La adiponectina disminuye con la diabetes tipo 2. La adiponectina se mantuvo sin cambios con diabetes tipo 1. La adiponectina fue mayor en los controles normales y en pacientes tipo 1 en comparación con el tipo 2 (véase la Tabla 2). La adiponectina disminuyó y luego aumento con HbA1c. Todas las diferencias son pequeñas y no muy significativas con valores T por debajo de 1,4 (Probabilidad de < 80 % de significancia). Las diferencias de adiponectina no fueron predictivas del BMI (índice de masa corporal).

- 55 El uso de una proporción de adiponectina HMW / total mejora las diferencias en las poblaciones y mantiene las mismas tendencias observadas con la adiponectina. La proporción aumenta con la enfermedad. Adiponectina HMW / total disminuye con HbA1c alta (Véase la Tabla 3). Una vez más el diagnóstico tipo 1 está menos correlacionado

con una mayor adiponectina HMW / total que un diagnóstico de tipo 2. Sin embargo, el diagnóstico de diabetes tipo 1 produjo una proporción mayor que los controles normales.

- 5 Los niveles totales de AdipoR1 soluble del terminal C aumentan con la patología de la diabetes (por ejemplo, diabetes tipo 2 o resistencia a la insulina). Estas diferencias son mucho más significativas que para la adiponectina o la relación de HMW (valor T > 3,8, probabilidad de > 99,9 % de significancia) (Véase la Tabla 4). Sorprendentemente, AdipoR1 aumenta con la diabetes tipo 1 indicando que el receptor también está relacionado con el tipo 1. Se esperaría que estos pacientes también sufrieran de adipocitos en equilibrio, pero también tienen pérdida de células beta. AdipoR1 aumenta más con HbA1c más elevada que la adiponectina. En general, AdipoR1 es más sensible que la adiponectina y la relación de HMW. La combinación de AdipoR1 y la adiponectina en una relación matemática era mejor que la adiponectina sola en la predicción de la patología de la diabetes. La combinación de AdipoR1 y péptido C en una relación matemática también fue mejor que el péptido C solo en la predicción de la patología de la diabetes.

Tabla 2. Adiponectina

	Recuento total	Adiponectina (µg / mL) en plasma		
		Promedio	DE	Valor T
Normal por historia médica	50	7,8	4,7	
HbA1c <7 (solo diabéticos)	40	8,2	10,0	-0,1
HbA1c 7 a 10 (solo diabéticos)	26	6,8	5,2	0,9
HbA1c >10 (solo diabéticos)	3	8,4	1,4	-0,1
Tipo 1 por diagnóstico	13	10,0	7,1	-1,3
Tipo 2 por diagnóstico	56	7,1	8,3	0,6

15

Tabla 3. HMW / adiponectina

	Recuento total	Adiponectina HMW/ total (µg / µg)		
		Promedio	DE	Valor T
Normal por historia médica	50	0,390	0,266	
HbA1c <7 (solo diabéticos)	40	0,926	2,553	-1,3
HbA1c 7 a 10 (solo diabéticos)	26	0,551	0,342	-1,8
HbA1c >10 (solo diabéticos)	3	0,607	0,281	-1,2
Tipo 1 por diagnóstico	13	0,529	0,277	-1,7
Tipo 2 por diagnóstico	56	0,830	2,137	-1,4

Tabla 4. AdipoR1 soluble

	Recuento total	sADIPOR1 (unidades relativas)		
		Promedio	DE	Valor T
Normal por historia médica	50	16,2	4,3	
HbA1c <7 (solo diabéticos)	40	22,4	6,0	-5,0
HbA1c 7 a 10 (solo diabéticos)	26	20,6	5,1	-3,5
HbA1c >10 (solo diabéticos)	3	28,1	6,0	-4,3
Tipo 1 por diagnóstico	13	23,7	5,5	-5,3
Tipo 2 por diagnóstico	56	21,3	5,7	-5,2

Ejemplo 2 - Detección de fragmentos del terminal C en individuos que tienen síndromes metabólicos y otros trastornos cardiovasculares y coronarios

- 5 Otro grupo de 188 pacientes fue completamente caracterizado para las condiciones y riesgos cardiovasculares por medio de diferentes pruebas y angiografías de diagnóstico. Se consideraron como normales (n = 113) aquellos sin síndrome metabólico, diabetes, síndrome coronario agudo (ACS), AMI o CHF. Los pacientes fuera del grupo de 188 fueron colocados en grupos afectados por síndrome metabólico, marcadores inflamatorios, ACS, AMI y CHF, hipertensión, obesidad, lipidemia, respuesta inflamatoria y respuesta anti-inflamatoria. El síndrome coronario agudo fue definido como un bloqueo > 60% por medio de una evaluación angiográfica con o sin condición cardíaca aguda.
- 10 El síndrome metabólico se definió por medio de la resistencia a la insulina o más de dos factores de riesgo metabólico por la definición de la OMS. La resistencia a la insulina se evaluó por medio de diagnóstico y medicación para diabéticos. Los factores de riesgo metabólicos incluyen hipertensión, lipidemia y obesidad. Se evaluó la obesidad por medio del índice de masa corporal (BMI). La hipertensión se evaluó por medio de la presión arterial o la medicación. Se evaluó la lipidemia por medio de la relación de lípidos o medicación para reducción de los lípidos.
- 15 Se evaluó la inflamación por medio del recuento de glóbulos blancos o CRP. Se evaluó el estado antiinflamatorio por medio de un inmunoensayo para inhibidores de tripsina urinaria en sangre y orina (mediciones del inmunoensayo para Bikunina y Uristatina). Todos los pacientes fueron evaluados adicionalmente por medio de la historia médica y medicación y caracterizados por lo tanto en grupos afectados.
- 20 Se midieron la adiponectina, y la adiponectina HMW usando un kit comercial de ELISA. Se midieron los marcadores cardíacos usando el instrumento Centaur (Bayer). El ensayo de ELISA para AdipoR1 descrito en el Ejemplo 1 fue usado para medir todos los fragmentos del terminal C ya sea enlazados o no enlazados.

- 25 La adiponectina disminuye con la ASC y el síndrome metabólico, pero la significancia de los valores fue menor que la esperada para el 99,9% de certeza (Véase la Tabla 5). La adiponectina se incrementó con CHF y MI que interferiría con la evaluación. La adiponectina no fue tampoco muy correlacionada con el estado inflamatorio.

- Los niveles totales de AdipoR1 soluble en suero se incrementan con ASC y el síndrome metabólico y la significancia de los valores fue muy significativa (99,9% de certeza) y mucho más significativa que aquella observada para la adiponectina (véase la Tabla 6). Sorprendentemente AdipoR1 se incrementa a medida que las condiciones se tornan más agudas y a medida que se incrementa la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria. Se predijo adicionalmente AdipoR1 para el síndrome metabólico. También se encontró AdipoR1 soluble en orina y en plasma se correlaciona con el síndrome metabólico.
- 30

Tabla 5. Adiponectina

	Recuento total	Promedio en plasma de adiponectina (µg/mL)	DE	Valor T (2)
Normales	113	10,3	7,0	
ACS o síndrome metabólico	24	5,7	2,7	3,2
Síndrome metabólico	29	6,1	3,5	3,2
ACS y sin AMI o CHF	36	7,1	6,7	2,5
MI por medio de diagnóstico o TnI	8	15,9	12,6	2,1
CHF por medio de diagnóstico o BNP	9	22,2	15,2	4,4
0-30% de bloqueo por medio de angiograma (1)	32	7,8	8,0	1,7
30-60% de bloqueo por medio de angiograma (1)	15	9,6	8,2	0,4
60-100% de bloqueo por medio de angiograma (1)	40	7,6	7,8	2,1
Hipertensión	52	9,0	7,9	1,1
Obesidad	60	7,1	6,0	3,1
Lipidemia	17	5,5	2,5	2,8
Respuesta inflamatoria	31	7,7	7,3	1,8
Respuesta antiinflamatoria	33	8,7	8,2	1,2
(1) Incluye pacientes con AMI y CHF				
(2) La significancia es del 99,9% de probabilidad o 0,01 de dos colas cuando el valor T es mayor a > 3,8				

Tabla 6. AdipoR1 soluble

	Recuento total	Adiponectina en plasma (µg/mL)	DE	Valor T (2)
Normales	113	16,5	4,0	
ACS o síndrome metabólico	24	24,6	5,4	8,3
Síndrome metabólico	29	29,9	10,0	11,2
ACS y sin AMI o CHF	36	24,1	5,3	9,0
MI por medio de diagnóstico o TnI	8	30,5	8,1	8,7
CHF por medio de diagnóstico o BNP	9	22,0	4,2	3,9

(continuación)

	Recuento total	Adiponectina en plasma (µg/mL)	DE	Valor T (2)
0-30% de bloqueo por medio de angiograma (1)	32	20,8	3,7	5,3
30-60% de bloqueo por medio de angiograma (1)	15	27,4	5,4	9,4
60-100% de bloqueo por medio de angiograma (1)	40	29,3	8,9	12,1
Hipertensión	52	23,3	5,6	8,8
Obesidad	60	23,3	6,8	8,3
Lipidemia	17	25,5	8,2	7,2
Respuesta inflamatoria	31	23,4	8,9	6,2
Respuesta antiinflamatoria	33	22,0	4,8	6,5
Normales	113	16,5	4,0	
incluye AMI y CHF > 2,4 es aproximadamente 99% de probabilidad o 0,01 de dos colas, > 3,8 es aproximadamente 99,9% de probabilidad o 0,001 de dos colas				

Ejemplo 3 - Elucidación de la ruta bioquímica

5 Resultados normales de sensibilidad de la insulina cuando la insulina provoca que las células grasas produzcan adiponectina. La adiponectina de longitud completa se agrega en multímeros, típicamente llamadas formas LMW, MMW y HMW. La adiponectina interactúa con el receptor 2 de adiponectina en el hígado y el receptor 1 de adiponectina en el músculo para detener la producción de glucosa y provocar glicólisis y oxidación de ácidos grasos. El receptor 1 de adiponectina reacciona con una forma escindida de adiponectina llamada adiponectina globular donde el receptor 2 adiponectina reacciona con la adiponectina de longitud completa. Recientemente se demostró por parte de otros que la adiponectina globular se forma por la acción de la elastasa en sangre.

10 La resistencia a la insulina se presenta cuando los adipocitos se vuelven hipertróficos y producen menos adiponectina en respuesta a la insulina. En este estado, las células se vuelven más apoptóticas y se hace lenta la división celular. Como resultado, disminuyen los niveles de adiponectina en plasma. Los niveles de insulina se elevan en un esfuerzo por provocar que las células liberen más adiponectina. Sin embargo, a medida que empeora la resistencia a la insulina, se produce más insulina y menos adiponectina. Entre menos adiponectina se traduce en menos glicólisis y menos oxidación de ácidos grasos en el músculo y se evita que se detenga la producción de glucosa en el hígado.

15 Se confirmó que la elastasa inflamatoria y los glóbulos blancos se elevan significativamente en pacientes con diabetes. Una revisión de la literatura está de acuerdo en que tanto la insulina elaborada por el hombre como la insulina natural incrementan los glóbulos blancos e los diabéticos. A medida que se aumenta la elastasa en una inflamación, se produce un mayor porcentaje de adiponectina globular. La carencia de multímeros provoca una menor acción sobre el hígado. Se confirmó que los inhibidores de la proteasa antiinflamatoria (Uri y Bik) se elevaron significativamente en la diabetes. Estos inhibidores se forman por la elastasa y se demostró recientemente que inducen en nuestros modelos de células apoptosis hipertrófica en líneas de células normales.

20 Los fragmentos del receptor después de la exposición a la elastasa fue propuesta como mecanismo para la formación del fragmento soluble en muestras de pacientes. Esto fue probado usando espectroscopia de masas por afinidad con un anticuerpo policlonal para el terminal C de AdipoR1 y muestras de pacientes.

25 Se confirmó por medio de espectros de masas que AdipoR1 estaba en la sangre en una masa de 34, 28 - 29, 19 - 18, 15 - 13, 9,5 - 9,0, 7,9, 6,6, 6,5, 5,2, 4,0 a 3,8 y 1 a 2 kDa. Estos datos confirmaron que 1) que se encontraban fragmentos de AdipoR1 en pacientes en controles, 2) fragmentos de AdipoR1 forman dímeros, y 3) fragmentos de AdipoR1 se enlazaron con adiponectina. Esto último fue probado por repetición de la espectroscopia de masas por

afinidad con un anticuerpo policlonal para la adiponectina.

La carencia de multímeros de adiponectina durante la resistencia a la insulina fue propuesta adicionalmente como la causa potencial de diferencias en los patrones de fragmentación entre pacientes e individuos normales. En realidad, se presentó una desaparición de las formas de las masas 3,9 y 7,8 en diabéticos, pero estaban presentes en todas los individuos normales. En los datos presentados más abajo, todos los 5 pacientes carecían de estas masas y todos los 5 individuos normales tenían las masas de 3901 y el 7814 Da (véase los datos de la gráfica). Por lo tanto, se piensa que las diferentes masas son debidas a la exposición de sitios de escisión proteolíticos cuando existe disponibilidad de multímeros para enlazamiento.

Ejemplo 4 - Preparación de anticuerpos monoclonales

Se inmunizaron ratones BALB/c con 100 µg / ratón de una composición sintética inmunógena del péptido AdipoR1. Después de un mes, se tomaron sangrados oculares de cada ratón y se titularon por medio de ELISA contra el inmunógeno para evaluar la respuesta inmune. Los ratones que mostraron la mejor respuesta recibieron una inyección de refuerzo de 100 µg/ratón con el inmunógeno. Después de cuatro días, se sacrificaron los ratones y se utilizaron sus bazos para fusión de acuerdo con el método de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Se fusionaron los esplenocitos con células de mieloma SP2-0 Ag 14 usando una solución de PEG (polietilén glicol) con una relación de esplenocitos con respecto a células de mieloma de 5:1 y se sembraron en placas de 96 pozos usando medio de crecimiento PEG/HAT al 50%. Después de 7 - 10 días de incubación a 37 grados Celsius, se hizo seguimiento a los cultivos de fusión con respecto al crecimiento alimentándolos cada 3 - 4 días utilizando el método de selección HAT (hipoxantina aminopterina, timidina) seguido por un subcultivo con medio de cultivo HAT.

Después de 2 - 3 semanas, se analizaron los pozos que tenían colonia de hibridoma por medio de ELISA para determinar qué cultivos produjeron una respuesta inmune a los anticuerpos para el péptido. Se analizaron los cultivos en placas de 96 pozos con el péptido uristatina con placas recubiertas a razón de 1 µg / mL. Después de recubrir las placas durante la noche a 2 - 8°C, se lavaron y bloquearon todas las placas. Se aplicaron luego los sobrenadantes del cultivo celular a razón de 100 µL / pozo durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas se aplicó IgG antirratón de cabra / peroxidasa de rábano en diluciones 1:2000 a razón de 100 µL / pozo durante 1 hora. Se lavaron las placas una vez más seguido por el sustrato OPD (diclorhidrato de o-fenilen diamina) y se leyó a 490 nm en un lector de placas Spectra Max.

Las colonias que dieron una respuesta positiva fueron transferidas a placas de 24 pozos para expansión adicional y analizadas nuevamente para verificar los resultados positivos. Las colonias que dieron positivo fueron expandidas adicionalmente en placas de seis pozos en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) con suero bovino fetal al 10% (FBS). Después de la expansión, se congelaron las colonias se congelaron a - 70°C y luego fueron transferidas a nitrógeno líquido para almacenamiento durante largo plazo. Con base en los resultados del ELISA usando el péptido purificado, se expandieron adicionalmente varios clones en IMDM, FBS al 1,0% y se congelaron nuevamente.

Ejemplo 5 - Caracterización de anticuerpos monoclonales con SELDI

Se llevó a cabo un método de medición de los fragmentos específicos de AdipoR1 en muestras de pacientes usando anticuerpos monoclonales y se analizaron los anticuerpos policlonales de conejo con estándares solubles de AdipoR y plasmas de pacientes sobre superficies de chips. Se estimó el enlazamiento por medio del análisis de desorción-ionización por láser mejorado de superficie (SELDI) sobre un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo SELDI PBS II (CIPHERGEN, Fremont, California) para determinar las relaciones de masa a carga (m/z) para el enlazamiento de proteínas con los anticuerpos. Se analizaron adicionalmente 10 especímenes de plasma de pacientes: 5 pacientes fueron positivos para diabetes; 5 positivos fueron negativos para diabetes. Se midió el enlazamiento sobre dos tipos de superficies (PS20 y SR100) usando un procedimiento de incubación estándar. Se comparó la señal para cada medición de masa con el ruido de fondo para obtener las relaciones de señal a ruido (S/N). Únicamente se aceptaron masas con relaciones de S/N superiores a 10.

El procedimiento SELDI se hizo de la siguiente manera: se añadieron tres microlitros de NaHCO₃ en una concentración de 50 mmol/L (pH 8,0) a cada mancha en el chip de proteína y cubierta con una placa (es decir, un bioprocesador) para formar pozos de muestra, seguido por la adición de 1 µL de anticuerpo (1mg/mL) a cada mancha y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación en una cámara de humedad controlada. Se lavó dos veces la solución de cada mancha en ese momento con 5 µL de amortiguador de lavado (solución salina amortiguada con fosfato (PBS) + detergente Triton al 0,5%). Se bloquearon los sitios no enlazados con 5 µL ya sea de 2 mg / mL de BSA (albúmina de suero bovino) o 1 mol / L de etanolamina. Después de incubación a temperatura ambiente, se descartó la BSA o la etanolamina y se lavaron dos veces las manchas con 5 µL de amortiguador de lavado (PBS + Triton al 0,5%). Se añadieron 5 µL de PBS a cada mancha y se colocaron los chips en el bioprocesador. Se añadieron a cada pozo 10 µL adicionales de PBS, así como 10 µL de la muestra que iba a ser analizada (o PBS como control), seguido por agitación de los pozos sellados a 4°C durante 18 horas. Se lavaron luego los pozos con amortiguador de lavado y PBS y se agitó nuevamente a temperatura ambiente durante 2

minutos. Se enjugaron dos veces los pozos con 300 µL de agua desionizada saturada con ácido sinapínico; esto sirve como una molécula que absorbe energía durante la protonación de las proteínas enlazadas con los anticuerpos. Estos últimos se unen a la superficie de los chips. Se analizaron los chips que contienen los especímenes enlazados con el anticuerpo por medio de la masa de enlazamiento usando el espectrómetro de masas SELDI de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 6 - Fragmentos solubles del terminal C en diabéticos

La Tabla 6 muestra los resultados de múltiples determinaciones para cinco pacientes normales para la detección de una masa de un fragmento del receptor de adiponectina de 7812 y cinco diabéticos que no tenían la misma masa. Se encontró una separación similar para una masa de 3901. Estas dos masas están presentes en sujetos normales pero ausentes o presentes en niveles muy bajos, es decir, menores niveles en sujetos que tienen las condiciones de enfermedad suministradas aquí.

Tabla 6. Resultados de SELDI con 7812 y 3901 daltons

Condición del paciente	Número de pacientes	Número de pacientes con masas con 3901	Número de pacientes con masas con 7812
Diabéticos	5	0	0
No diabéticos	5	5	5

La Tabla 7 muestra los resultados de determinaciones múltiples para cinco pacientes normales y diabéticos para la detección de fragmentos del receptor de adiponectina que tienen masas de 4,5 - 6,9, 7 - 8,2, 9 - 11, 13 - 15, 17 - 19, 27 - 29, o 30 - 34 y 5 diabéticos que no tienen las mismas masas.

Tabla 7. Resultados SELDI a 4,5 - 6,9, 7 - 8,2, 9 - 11, 13 - 15, 17 - 19, 27 - 29, o 30 - 34 KDa Daltons

Condición del paciente	Número de pacientes	Número de pacientes con 4,5 - 6,9, 7 - 8,2, 9 - 11, 13 - 15, 17 - 19, 27 - 29, o 30 - 34 KDa	Número de pacientes con incrementos en la cantidad de 4,5 - 6,9, 7 - 8,2, 9 - 11, 13 - 15, 17 - 19, 27 - 29, o 30 - 34 KDa
Diabéticos	5	5	5
No diabéticos	5	5	5

Ejemplo 7 - serina proteasas

La serina proteasas de la familia de la tripsina se incrementan durante la inflamación e incluyen tripsina, quimiotripsina, kalikreina, plasmina, complemento D, trombina, y los Factores IXa, Xa, XIa y XIIa. Todas tienen afinidad primaria por la triptasa que escinde Arg-Xaa o Lys-Xaa. Serina proteasas adicionales de la familia de la tripsina liberadas por células inmunes incluyen elastasa, granzima (A, B, H, M), triptasa 2 y proteasas 1 de mastocitos. Los homólogos clave de la elastasa incluyen catepsina G, proteinasa 3, azurocidina y micolobastina que tiene afinidad de escisión Val-Xaa > Ala-Xaa afinidad escindir, las granzimas A y K tienen afinidad de escisión por la triptasa. La granzima B tiene afinidad de escisión por la aspasa para Asp-Xaa. La granzima M tiene afinidad de escisión por la metaza para Met-Xaa o Leu-Xaa. La granzima H y la proteasa 1 de mastocitos tienen afinidad de escisión por la quimasa para la escisión de Phe-Xaa, Tyr-Xaa, o Trp-Xaa.

Los análisis de los patrones de fragmentación para los fragmentos de adiponectina y del receptor de adiponectina se determinaron utilizando tripsina y elastasa como ejemplo de proteasas inflamatorias. Los fragmentos que tienen 29 a 34 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 1, 2, 4 - 11, 16, 17, y/o 19 - 26) fueron predichos por la escisión con la elastasa. Los fragmentos que tienen de 20 a 25 aminoácidos de longitud (es decir, las SEQ ID NOs: 3 12 - 15, 18 y/o 27 a 30) fueron predichos por las serina proteasas de la familia general de la tripsina o la granzima.

Ejemplo 8 - Ajuste de la sensibilidad y la especificidad

Las muestras se dividen entre normales y anormales. Se recolectan los resultados para todas y los valores observados de AdipoR1 se juzgan contra un umbral asignado de AdipoR1. El umbral es el valor por debajo del cual

todos los resultados se consideran normales y por encima del cual los resultados se consideran positivos. El umbral se varía desde un número bajo hasta un número alto y se calcula el valor predicho de los resultados, y usando el número de positivos verdaderos, positivos falsos, negativos verdaderos y negativos falsos encontrados. La sensibilidad ($TP / TP + FP$) y la especificidad ($TN / TN + FN$) se calculan para cada umbral analizado. El umbral con la sensibilidad y la especificidad más altos produce los mejores valores predictivos (100% sería el ideal).

Ejemplo 9 - Umbrales del fragmento de adiponectina

El siguiente es un ejemplo del ajuste del umbral usando los pacientes y los métodos mostrados en el Ejemplo 1. En la Tabla más abajo, el umbral por encima del cual se consideró positivo el resultado de AdipoR1 resultado se varía desde 15 hasta 21 $\mu\text{g} / \text{mL}$. En este ejemplo, un mayor valor se considera un positivo. El número de negativos verdaderos, o los pacientes correctamente identificados sin diabetes diagnosticada, se calcula junto con el número de positivos falsos, negativos falsos y positivos verdaderos. Idealmente, un ensayo no tendría positivos falsos o 100% de especificidad y no tendría negativos falsos o 100% de sensibilidad. Como puede observarse a partir de los datos, el umbral de 15 μg mejor para sensibilidad, mientras que el umbral de 21 fue mejor para especificidad. El umbral y el rango dependen del fragmento detectado y del método analítico utilizado. En este ejemplo, el rango total del ensayo fue de 5 a 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$ o aproximadamente 6X. Por lo tanto, las unidades de concentración y el rango variaron con el fragmento detectados y el método analítico utilizado (SELDI vs ELISA). Por ejemplo, para el fragmento analizado en el Ejemplo 6 y en la Tabla 7, la diferencia entre los individuos normales y los diabéticos fue a menudo de 100X. Como se esperaba, la concentración de un fragmento específico fue menor que la concentración de todos los fragmentos. El tipo de muestra utilizada, ya sea orina, plasma o suero también impactó las concentraciones del fragmento. La orina y el suero tenían concentraciones del fragmento aproximadamente 10 veces menores que el plasma. Una vez se seleccionó un ensayo y el fragmento, se ajustan los umbrales para lograr mejor el acuerdo clínico deseado, usando los métodos mostrados.

Tabla 8

Umbral de AdipoR1	Negativo verdadero (TN)	Positivo falso (FP)	Positivo verdadero (TP)	Negativo falso (FN)
$\geq 15 \mu\text{g/mL}$	19	31	62	7
≥ 16	22	28	58	11
≥ 17	26	24	54	15
≥ 18	33	17	50	19
≥ 19	39	11	45	24
≥ 20	43	7	41	28
≥ 21	44	6	37	32

Ejemplo 10 - Uso de paneles para ensayos de desequilibrio de adipocitos

El siguiente es un ejemplo del uso de biomarcadores adicionales y relacionados con el resultado de AdipoR1 para mejorar la predicción del trastorno diabético. Se usan pacientes diabéticos y normales y los métodos mostrados en el Ejemplo 1. En la tabla a continuación, se comparan tres análisis por su habilidad para detectar diabetes. Los umbrales utilizados ofrecieron TN comparables. Como se esperaba, ADIPOR1 detectó más positivos verdaderos que los otros análisis.

Tabla 9

Analito	Umbral utilizado para definir un positivo	TN	FP	TP	FN	Tipo 1 neg	Tipo 1 pos
Adiponectina	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	46	4	24	45	21	4
Péptido C	$< 300 \text{ pmoles/L}$	41	9	10	59	6	19
Péptido C	$> 2700 \text{ pmoles/L}$	48	2	21	48	23	2
AdipoR1	$\geq 21 \mu\text{g/mL}$	44	6	37	32	15	10

Veinticinco de los sesenta y nueve diabéticos eran tipo 1. Se compararon también los analitos por la capacidad para ser positivos para la diabetes tipo 1. Sólo 4 de los 25 diabéticos tipo 1 tenían una adiponectina anormalmente baja. El péptido C utiliza dos umbrales, uno para niveles anormalmente bajos y otro para niveles anormalmente altos. Un péptido C anormalmente bajo, indica una falta de insulina y como se esperaba 23 de los 25 diabéticos tipo 1 tenían el péptido C anormalmente bajo. Los diabéticos tipo 1 también tenían a menudo fragmentos AdipoR1. Pocos diabéticos tipo 1 tenían péptido C anormalmente alto.

Estos analitos detectan pacientes diferentes. Esto probablemente se explica por diferencias en la patología, ya que cada analito mide una parte diferente del desequilibrio. Por ejemplo, se cree que la falta de insulina que impacta el péptido C se debe a las células de los islotes mientras que la falta de adiponectina se debe a los adipocitos que no producen la hormona. Se cree que la presencia de fragmentos adipoR1 en este ejemplo se debe a las células musculares que derraman el receptor de más uso.

Estos datos demuestran que la combinación de los analitos juntos podría ser mejor que cualquiera de ellos solo. En la tabla de abajo, se analiza la más simple de las relaciones al considerar que cualquiera de los positivos del panel significa que el resultado es anormal. Por lo tanto, todos los analitos deben ser negativos para ser considerados como un resultado normal. Como se describió anteriormente, los umbrales se ajustan para conseguir los mejores resultados.

Tabla 10

ADIPOR1	Péptido C anormalmente alto	Péptido C anormalmente bajo	Adiponectina	TN	FP	TP	FN
≥ 21	≥ 2700	No utilizado	No utilizado	43	7	47	22
≥ 21	≥ 2700	≤ 300	No utilizado	34	5	37	18
≥ 21	No utilizado	No utilizado	≤ 4	34	16	50	19
≥ 21	≥ 2700	No utilizado	≤ 4	41	9	53	16

El número más alto de los positivos verdaderos se obtuvo para el uso combinado del péptido C, adiponectina y adipoR1. El número más alto de negativos verdaderos se obtuvo para el uso combinado del péptido C y adipoR1 o por el uso del péptido C, adiponectina y adipoR1. En ambos casos, el número de negativos verdaderos fue comparable al de adipoR1.

Ejemplo 11 - Niveles del receptor 1 de adiponectina soluble en el plasma de pacientes de CAD

El siguiente es un ejemplo del uso de biomarcadores adicionales y relacionados con la AdipoR1 que resulta que mejora la predicción del trastorno cardiovascular. Se utilizan el trastorno cardiovascular y pacientes normales y métodos mostrados en el ejemplo 2. Los pacientes afectados fueron aquellos con ACS por angiografía o alto riesgo, que cumplen la definición de síndrome metabólico. Los pacientes con afecciones cardiovasculares preexistentes, tales como AMI y CHF fueron excluidos dado que ya se había hecho un diagnóstico por medio de los ensayos de Tnl o BNP u otras evaluaciones de diagnóstico.

Los fragmentos solubles del terminal C del receptor 1 de adiponectina se midieron por medio de ELISA como se muestra en el Ejemplo 1. Los resultados se correlacionaron bien con grados de obstrucción vascular (Tabla 11). El riesgo de trastornos cardiovasculares también se evaluó mediante un marcador adicional para la respuesta pro y antiinflamatoria y la adiponectina. Los analitos para respuesta pro y antiinflamatoria se compararon con la adipoR1. Los resultados anormales de AdipoR estaban más probablemente presentes en pacientes con obstrucción vascular que con adiponectina, uristatina, bikunina, WBC o CRP. La sensibilidad más alta apoya una correlación de diagnóstico del receptor 1 de adiponectina por obstrucción vascular debido a la aterosclerosis.

Tabla 11

Sensibilidad de los fragmentos solubles del receptor 1 de adiponectina por aterosclerosis		
Marcador	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)
Bikunina	95	25
Uristatina	95	25
CRP	95	15
WBC - total	80	25
WBC - gran	85	25
Bikunina y uristatina	90	45
Relación de riesgo lipídico	95	20
Adiponectina	85	20
AdipoR1 soluble en plasma	85	75

El uso de paneles de respuesta pro y antiinflamatoria y de marcadores de adipocito se comparó por la capacidad para detectar trastornos cardiovasculares. El mayor número de positivos verdaderos se obtuvo para el uso combinado de la bikunina, uristatina, CRP, WBC, adiponectina y adipoR1. El mayor número de negativos verdaderos se obtuvo para el uso combinado de adiponectina y adipoR1.

Cada intervalo citado incluye todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos, así como los numerales específicos contenidos allí.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: Fragmento 1 del receptor 1 de adiponectina vlvvaaafvh fygvsnlqef rygleggctd dtll

SEQ ID NO: 2: Fragmento 2 del receptor 1 de adiponectina Ivvaaafvh fygvsnlqef rygleggctd dtll

SEQ ID NO: 3: Fragmento 3 del receptor 1 de adiponectina snlqef dtll

SEQ ID NO: 4: Fragmento 4 del receptor 1 de adiponectina vvaafvh fygvsnlqef rygleggctd dtll

SEQ ID NO: 5: Fragmento 5 del receptor 1 de adiponectina vaaafvh fygvsnlqef rygleggctd dtll

SEQ ID NO: 6: Fragmento 6 del receptor 1 de adiponectina aaafvh fygvsnlqef rygleggctd dtll

SEQ ID NO: 7: Fragmento 7 del receptor 1 de adiponectina aafvh fygvsnlqef rygleggctd dtll

SEQ ID NO: 8: Fragmento 8 del receptor 1 de adiponectina afvh fygvsnlqef rygleggctd dtll

SEQ ID NO: 9: Fragmento 9 del receptor 1 de adiponectina fvh fygvsnlqef rygleggctd dtll

- SEQ ID NO: 10: Fragmento 10 del receptor 1 de adiponectina vh fygvsnlqef rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 11: Fragmento 11 del receptor 1 de adiponectina h fygvsnlqef rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 12: Fragmento 12 del receptor 1 de adiponectina fygvsnlqef rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 13: Fragmento 13 del receptor 1 de adiponectina ygvsnlqef rygleggcctd dtll
- 5 SEQ ID NO: 14: Fragmento 14 del receptor 1 de adiponectina gvsnlqef rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 15: Fragmento 15 del receptor 1 de adiponectina vsnlqef rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 16: Fragmento 16 del receptor 1 de adiponectina nlqef rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 17: Fragmento 17 del receptor 1 de adiponectina lqef rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 18: Fragmento 18 del receptor 1 de adiponectina qef rygleggcctd dtll
- 10 SEQ ID NO: 19: Fragmento 19 del receptor 1 de adiponectina ef rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 20: Fragmento 20 del receptor 1 de adiponectina f rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 21: Fragmento 21 del receptor 1 de adiponectina rygleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 22: Fragmento 22 del receptor 1 de adiponectina yleggcctd dtll
- SEQ ID NO: 23: Fragmento 1 del receptor 2 de adiponectina ifvvagafvh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- 15 SEQ ID NO: 24: Fragmento 2 del receptor 2 de adiponectina vagafvh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 25: Fragmento 3 del receptor 2 de adiponectina snlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 26: Fragmento 4 del receptor 2 de adiponectina fvvagafvh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 27: Fragmento 5 del receptor 2 de adiponectina vvagafvh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 28: Fragmento 6 del receptor 2 de adiponectina agafvh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- 20 SEQ ID NO: 29: Fragmento 7 del receptor 2 de adiponectina gafvh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 30: Fragmento 8 del receptor 2 de adiponectina afvh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 31: Fragmento 9 del receptor 2 de adiponectina fvh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 32: Fragmento 10 del receptor 2 de adiponectina vh fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 33: Fragmento 11 del receptor 2 de adiponectina h fhgvsnlqef rtmigggcse edal
- 25 SEQ ID NO: 34: Fragmento 12 del receptor 2 de adiponectina fhgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 35: Fragmento 13 del receptor 2 de adiponectina hgvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 36: Fragmento 14 del receptor 2 de adiponectina gvsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 37: Fragmento 15 del receptor 2 de adiponectina vsnlqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 38: Fragmento 16 del receptor 2 de adiponectina nlqef rfmigggcse edal
- 30 SEQ ID NO: 39: Fragmento 17 del receptor 2 de adiponectina lqef rfmigggcse edal
- SEQ ID NO: 40: Fragmento 18 del receptor 2 de adiponectina qef rfmigggcse edal

SEQ ID NO: 41: Fragmento 19 del receptor 2 de adiponectina ef rfmigggcse edal

SEQ ID NO: 42: Fragmento 20 del receptor 2 de adiponectina f rfmigggcse edal

SEQ ID NO: 43: Fragmento 21 del receptor 2 de adiponectina rfmigggcse edal

SEQ ID NO: 44: Fragmento 22 del receptor 2 de adiponectina fmigggcse edal

5 SEQ ID NO: 45: secuencia de ácido nucleico del receptor 1 de adiponectina

```

ggcgctgaag atcgggggcgg ctcgggccgca ggcgcgcctcc agcgccgcggg gatgtagcgc
gggggacccg gggcccccagc agagcccgcc tgcgcggctt gtctaccatc agagggagat
ctctgcccc tggggctgag agacccccaa ctttccccc a gctgaagctg caggggtattg
aggtaccagc cagatgtctt cccacaaagg atctgtggtg gcacagggga atggggctcc
tgccagtaac aggggaagctg acacgggtgga actggctgaa ctggggacccc tgctagaaga
gaagggc aaa cyggtaatcg ccaacccccc caaagctgaa gaagagcaaa catgcccagt
gccccaggaa gaagaggagg aggtgcgggt actgacactt cccctgcang cccaccacgc
catggagaag atgggaagagt ttgtgtacaa ggtctgggag ggacggttga gggtcacccc
atatgatgtg ctccctgact ggctaaagga caacgactat ctgctacatg gtcatagaac
tcccattgccc tcccttctggg ctgcttcaa gagcaacttc cgcattcata cagaaectgg
caacatcttg acccatctgc ttggttctgc gctgtttctc ttcttgggaa tcttgaccat
gtcagacca aatatgtact tcatggcccc tctacaggag aaggtggttt ttgggatgtt
ctttttgggt gcagtgctct gctcagctt ctcctggctc tttcacaccg tctattgtca
ttcagagaaa gtctctcgga ctttttccaa actggactat tcagggatg ctcttctaat
tatggggagc ttgttccctt ggtctatata ttcttctac tgcctccccc agccacgggt
catctacctc tccatcgtct gtgtcctggg cattctctgc atcattgtgg cgcagtggga
ccggtttgcc actcctaagc accggcagac aagagcaggg gtgttctctg gacttggctt
gagtggcgtc gtgcccacca tgcactttac tatcgctgag ggcctttgtc aggccaccac
agtggggcag atgggctggt tcttctctat ggctgtgatg tacatcactg gagctggcct
ttatgctgct cgaattcccg agcgcttctt tccrggaaaa tttyacarat ggttccagtc
tcatcagatt tccatgtctc tgggtggggc agcagccttt gtccacttct atggagtctc
caaccttcag gaattccgtt accggcctaga agcgcgctgt actgatgaca ccttctctg
agccttccca cctgcggggt ggaggaggaa ctccccaagt gcttttaaaa ataacttctt
tgctgaagtg agaggaagag tctgagtgtc ctgtttctag aagaaacctc ttagnagaatt
cagtaccaac caagcttcag cccactttca caccactgg gcaataaact tccatttcc
attctcttag ctggggatgg ggcattggca aacttagcca tccctctctc agcaaggcat
ctaccggccc ctcaagaga cagtactttg aaactcatgt tgagatttta cctctctctc
caaccatttt ggganaatta tggactggga ctcttcagaa attctgtctt ttcttctgga
agaaaatgtc cctcccttac cccatcctt aactttgtat cctggcttat aacaggccat
ccatttttgt agcacacttt tcaaaaacaa ttatataccc tggteccatc ttcttagggc
ctggatctgc ttatagagca ggaagaataa agccaccaac ttttacctag cccggctaata
catggaagtg tgtccaggct tcaagtaact tgagtcttaa tttttttttt ttcttggcag
agtaatgtaa aattttaaag gggaaagata tttaattatt aatactaagc tttaaaaaaga
aacctgctat cattgctatg tatcttgatg caaagactat gatgttaata aaagaaaagta
cagaagagac ttggcattca aagatttcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa

```

SEQ ID NO:46 - secuencia de aminoácidos del receptor 1 de adiponectina

```

mszhkgsvva qnggapasn eadtvelael gp1leakgr vianppkaee sqtcvvpqee
eeevrvltlp lqahhamekm eefvykweg rrvvipydvl pdwlkdndyl lhghrppmps
fracfsifr ihtetgniwt hl1gfvlflf lgiltmlrpn myfmaplqek vvfgmfflga
vlclafswlf htvyhsekv ertfshldys g1allimgsf vpwlyysfyc spqprliyls
ivcvgisai ivaqwdrfat pkhrqtragr flglglsgvv ptmhftiaeg fvkattvgqm
gwfflmavmy itgaglyaar iperffpgkf diwfqshqif hvlvvaafv hfvgvsnlqe
frygleggct ddtll

```

SEQ ID NO:47 - secuencia de ácido nucleico de la variante del receptor 1 de adiponectina

```

ggggcgctc ggccgcaggc cgcctccagc gccgcgggat gtagcgcggg ggaccgcggc
ccccagcaga gccgcctgc cggcttctgc taccatcaga gggagatctc tgccccctgg
ggctgagaga ccccaacctt ccccaagct gaagctgcag ggtattgagg taccagccag
atgtcttccc acaasaggatc tgtggtggca caggggaatg gggctctgc cagtaacagg
gaagctgaca cgggtggaact ggctgaactg ggaccctgc tagaagagaa gggcaaacgg
gtaategcca acccacccaa agctgaagaa gagcaaacat gccagtgcc ccaggaagaa
gaggaggagg tgccgggtact gacacttccc ctgcaagccc accacgccat ggagaagatg
gaagagtctg tgtacaaggc ctggggaggga cgttgagggg tcctcccata tgatgtgctc
cctgactggc taaaggacaa cgactatctg ctacatgggc atagacctcc catgccctcc
tttcgggctt gcttcaagag catcttccgc attcatcacg aaactggcaa catctggacc

catctgcttg gtttctgtct gtttctcttt ttgggaatct tgacctgct cagaccaaatt
atgtacttca tggccctct acaggagaag gtgggttttg gtagtctctt tttgggtgca
gtgtctctgc tcagcttct cggctcttt cacaccgtct attgtctctc agagaaaagtc
ctcggactt tttccaaact ggactattca gggattgctc ttctaattat ggggagcttt
gtccccggc tctattatto ctctactgc tccccacagc cagggctcat ctacctctcc
atcgtctgtg tctggggcat ttctgcatc attgtgggc agtgggacc gtttgccact
cctaagcacc ggcagacaag agcaggcgtg ttcctgggac ttggcttgag tggcgtctgt
cccaccatgc actttactat cgttgagggc tttgtcaagg ccaccacagt gggccagatg
ggcrggtct tctcatggc tgggatgtac atcactggag ctggccctta tgcgtctga
attctgagc gottctttcc tggaaaattt gacatatggt tccagtctca tcagatttac
catgtctctg tgggtggcagc agcctttgtc cacttctatg gagtctccaa ccttcaggaa
ttccgttaag gcttagaagg cggctgtact gatgacacc ttctctgagc cttccacctt
ggggggtgga ggaggaaact cccaagtgt tttaaaaata acttctttgc tgaagtgaga
ggaagagctt gagttgtctg ttcttagaag aaacctctta gagaattcag taccaacca
gcttcagccc actttcacac ccactgggca ataaacttcc catctccatt ctctagctg
gggatggggc atggtcaaac cttagccatcc cctccctcagc aaggcatctc ccggccctc
acagagacag tactttgaaa ctcatgttga gattttaccc tctctccaa ccatcttggg
aaaaattagg actgggactc ctcaaaaatt ctgtctcttc ttctgggaaga aaatgtccct
cccttaccoc catctttaac ttgttatctt ggcttataac aggccatcca ttttctgagc
acaactttca aaaacaatta tataacctgg tcccatcttt ctagggcctg gatctgctta
tagagcagga agaataaagc caccaacttt tactagccc ggctaatacat ggaagtgtgt
ccaggcttca agtaacttga gttttaattt ttttttttt ctgggcagag taatgtaaaa
tttaaatggg gaaagatatt taatatttta tactaagctt taaaaagaaa cctgctatca
ttgctatgta tcttgatgca aagactatga tgttaataaa agaaagtaca gaagagactt
ggcattcaaa gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

5 SEQ ID NO:48 - secuencia de aminoácidos de la variante del receptor 1 de adiponectina

```

msshkgsvva qnggapasnr eadtvelael gpilleekgkr vianppkace eqtcvpvqee
eeevrvltip lqahhamekm eefvykweg rwrvipydvl pdwikndy1 lhghrppmps
fracfsifr ihtetgniwt hllgfvlflf lgiltmlrpn myfmaqlqek vvfgmfflga
vlclsfswlf htvyhsekvt srtfksldys gllallimgsf vpwlyysfyc spqprliyls
ivovlgisai ivaqwdrfat pkhrqtragr flglglsgvv ptmhftiaeg fvkattvgqm
gwhffimavmy itgaglyaar iperffpgkf diwfqshqly hvlvvaafv hfygvsnlqe
frygleggc: ddt11

```

SEQ ID NO:49 - secuencia de ácido nucleico del receptor 2 de adiponectina

```

agaatttgtt tgaaggtat ggaaggtcg gtggcgagtg atccctcatg atgtactacc
agactggctc aaggataatg ecttctctct gcattggacac cggcctccta tgccttctct
ccgggcccgt ttaagagca ttttcagaat acacacagaa acaggcaaca ttggacaca
ctcttaggt tgtgtatctt tctgtgctt ggggatcttt tatatgtttc gcccataat
ctccttcttg gccctctgac aagagaaggt ggtctcttga ttattttctt taggagccat
ctctgctctt tctctctcat ggctcttcca cacagtctac tgcactcag agggggctct
tcggctctct tctaaactgg attactctgg taattgctct ctgattatgg gaagttttgt
tcttggctt tattattctt tctactgtaa tccacaacct tgcctcatct acttgattgt
catctgtgtg ctgggcattg cagccattat agtctcccag tgggacatgt ttgccacccc
tcagtatcgg ggagtaagag caggagtgtt tttgggcta ggcttgagtg gaatcattcc
taccttgcat tatgtcatct cggaggggtt ccttaaggcc gccaccatag ggcagatagg
ctggttgatg ctgatggcca gcctctacat cacaggagct gccctgtatg ctgcccggat
cccgaacgc ttttccctg gcaaatgtga catctgtgtt cactctcatc agctgttcca
tatcttcttg gttgctggag ctcttgttca ctccatgggt gtctcaaac ccaggagtt
tcgtttcatg atcggcgggg gctgcagtga agaggatgca ctgtgatacc taccagctct
cagggactat gaccctaaac cagggcctgc ggcacctggc ggctctcccg ctggctactg
atgccagtac cagaggagcc ccaaaacctt gacagcctcg tgggctttgt gacggcccag
gggctctgag tggtagatga ctgagaagag aaaaacnaaa ataaatcata cctcaaggga
tggagtgcac caattgggag aaaaggagac atagcccaaa ccttggttta ttcttgggat
ctactgattg cgggctctgc aagaccttg gcaactggc ttctgatcca tatcatattt
attttagaaa gatggcgaaa cagtttagct ggtggctctt tctctctctt ttctctctct
ctatgacaat aatacaaac aatttaagt aacatttata tccgataagg ggtgggagtg
tgattttaaa tgcctctttg ggagaacaaa gaaattaatg taataaatg ttctaaactgt

```

```

ttaaataaga ctttatataa atgtttraaaa cataggggta agggaggagg ggagaatttt
tgtatagaat gaaacatgca agtaccacac actgttttgea ttttgacaaa aaagtgactg
taggatcagg tgatagcccc ggaatgtaca gtgtcttggg gcaccaagat gccttctaaa
ggctgacata ccttgggacc taatggggca gagagtatag ccttagccca gtggtgacat
gaccactccc tttggggagg ctagggtaga ggggagtggt atgtgttttc tcagtgggaag
cagcacatga gtgggtgaca ggatgtttaga naaaggctct agttagggtg tcattgtcat
ttgagngact gacacactcc tagcagctgg taaaggggtg ctggaggcca tggaggagct
ctagaacacat tagcatgggc tgatctgatt acttcctggc atcccgtcca cctttatggg
aagttctatt agaggggatgg gacagttttc catatccttg ctgtggagct ctggaacact
ctctaaattt cctctatta aaaatcactg ccttaactat acttcctctc tgagggaate
gaaatggacc tttctctgac atagtctctg gcatgggagc cagccacaaa tgagattctg
acgtgtccag gtttctcctg agctcatcta catagattgg tagacccttc ctttggatta
ggaaagatga gttttacctc tggtagactg tcttggtaag cctggatgtg acagacacct
cggctctcct tgaataagaa agccagcaga actcttaaaag ccagttgtag tacggagttg
tcagcactca ctgaacctca ctttacaggg ataagagtgg tgtggcattt taaatacaat
ggtatgttat tgccagggag tgaggtacaa gacgatggct catgtcacag gcctacctga
tacggtgtca gagaagtggt tggggaaagg atctggttca tgggaattctg atcttggccc
ataggtgaac caccanaata gtgctcaggt cttagggtac tgtcatcaaa gacttgggat
gactccatta tctcctgggg ttgtgggtat tagaactaaa tatggaggtc ctgagcatgg
ggactgggtg cctcagtagg tgtttgggaa tatgggaagg gtctcctatt tattcaatag
agttttctca gttattttcc tccctcgccc ttgcaatctc cagcaaaaagg tgggatctag
gaagaaagaa tccagtgtag aagttgagaa gaacttgaa cgttttgggtc tggataaggt
cactgtccta ggtgctaggt ggaccgagca aaagactcag tggatgaact ggtgcagtg
ctgacagaat aaagaacagt attaatccct ttgagaaagc atagtccagc aggacagtg
ccatttggac agaagcccac ttagtttctt gggagcaaca gcagtatca gaagccagac
ttgctcttcg gtcatgcact ttgggataca gcgtagaggt gcagccctgt cacaacacca
acagaagtag cagcctctgg gtgcagtcac ccacacccca aagctgggaag gatctggttc
aacatagcac aaacctttag gaaaaatgaa attaacatca ctgatgtgte atccagtaaa
atctcccttt ttggggtgtg tatgtgggca tgtgcccatt tctatgtgtg tgtctacgtg
cagctcacta ccaacagcct catgtgcact tgacctgaca gtgctcgtg agaactctca
ccaggttggc gcttgaatgc cttactctca gcagtcagag gcttgcttgc tctgtgcaga
tttttaattt tcttttttgg ccttaggctg gttgggacct ctacagcttc attctttcac
attaaatagt gacctttttc agtattttcc ctcttccctt ttataaatta tgctaaagcc
acaaagcaca tttttgggga tcatagaagg ttgggggtcc agaaaggcat ctgtgtgatg
gttccattga tgtgggattt cctacttgc tgtattctca gtttctaate aaaagaacca
aatgaaaaaa aaaaaaaaaa

```

SEQ ID NO:50 - secuencia de aminoácidos del receptor 2 de adiponectina

```

mneptenrlg cstrpepdir lrkghqltgt rrgcndshqg dlepilasv lsshhkkse
ehaysdeapq edegfmgmap llqahhamek meefvckvwe grwrviphdv lpdwlkdndf
llhghrppmp sfracfkstf rihtetgnlw thllgcvffl clgifymfrp nisfvaplqe
kvvfglfflg aillcisfswl fhtvychseg varlfskldy sgiallimga fvpwlyysfy
cnpqpcfiyl ivicvlgiaa iivsqwdmfa tpqyrgrvrag vflglglsgl iptlhyvise
gflkaatigq igwlmlmasl yitgaalyaa riperrfpqk cdiwfhshql fhifvvagaf
vhfhgvsnlg efrfmigggc seedal

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir una condición, determinar el avance de una condición, el inicio de una condición, o la eficacia del tratamiento de una condición, estando dicha condición **caracterizada por** un desequilibrio de adipocitos y siendo seleccionada del grupo que consiste de obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo II, síndrome metabólico, dislipidemia, enfermedad cardiovascular, hipertensión, obstrucción vascular, diabetes tipo I, inflamación y arteriosclerosis por medio de la detección de la fragmentación de un receptor de adiponectina en un sujeto que comprende la etapa de determinar el nivel de al menos un fragmento soluble del terminal C del receptor de adiponectina en una muestra de fluido biológico obtenida del sujeto,
- 5 en donde la etapa de determinar el nivel de al menos un fragmento soluble del terminal C comprende la determinación del nivel total de los fragmentos solubles del terminal C y en donde dicho método es para predecir dicha condición y un incremento del nivel total de fragmentos solubles del terminal C con relación a un sujeto no enfermo del receptor de adiponectina es indicativa de que dicho sujeto tiene una condición; o
- 10 en donde la etapa de determinar el nivel de al menos un fragmento soluble del terminal C comprende la determinación del nivel total de los fragmentos solubles del terminal C y en donde dicho método es para determinar el avance de una condición y un incremento en relación con una medición anterior es indicativa de un empeoramiento de dicha condición; o
- 15 en donde dicho al menos un fragmento soluble del terminal C tiene de 25 a 34 aminoácidos de longitud y comprende un péptido con una secuencia seleccionada del grupo de secuencias que consiste de las SEQ ID NOs: 1, 2, 4 a 10, 23, 24 y 26 a 33 o una secuencia con una identidad del 80% o mayor con el mismo y en donde una menor cantidad de dicho al menos un fragmento soluble del terminal C con 25 a 34 aminoácidos de longitud con respecto a un sujeto no enfermo del receptor de adiponectina es indicativo de que dicho sujeto que tiene una condición o un incremento con respecto a una medición anterior es indicativa de un empeoramiento de dicha condición; o
- 20 en donde dicho al menos un fragmento soluble del terminal C tiene de 13 a 24 aminoácidos de longitud y comprende un péptido con una secuencia seleccionada del grupo de secuencias que consiste de las SEQ ID NOs: 3, 12 a 22, 25 y 34 a 44 o una secuencia con una identidad del 80% o mayor con el mismo y en donde una mayor cantidad de dicho al menos un fragmento soluble del terminal C con 13 a 24 aminoácidos de longitud con respecto a un sujeto no enfermo del receptor de adiponectina es indicativo de que dicho sujeto que tiene una condición o un incremento con respecto a una medición anterior es indicativa de un empeoramiento de dicha condición.
- 25 2. El método de la reivindicación 1 en donde al menos un fragmento del terminal C está enlazado a adiponectina.
- 30 3. El método de la reivindicación 1 en donde al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina se detecta por medio de un anticuerpo.
4. El método de la reivindicación 1 en donde al menos un fragmento del terminal C enlazado a adiponectina se detecta por medio de un anticuerpo.
- 35 5. El método de la reivindicación 1 en donde la etapa de analizar la presencia de al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina en el fluido biológico comprende poner en contacto la muestra con un agente de enlazamiento específico para al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina.
6. El método de la reivindicación 5 en donde el agente de enlazamiento comprende un anticuerpo.
7. El método de la reivindicación 6 en donde el anticuerpo está marcado con una molécula reportera.
- 40 8. El método de la reivindicación 5 en donde la etapa de analizar la presencia de al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina en los fluidos biológicos comprende además poner en contacto la muestra con un segundo agente de enlazamiento específico para el primer agente de enlazamiento.
9. El método de la reivindicación 8 en donde el segundo agente de enlazamiento es un anticuerpo.
10. El método de la reivindicación 9 en donde el segundo agente de enlazamiento se marca con una molécula reportera.
- 45 11. El método de la reivindicación 1 en donde la etapa de analizar la presencia de al menos un fragmento del terminal C del receptor de adiponectina en el fluido biológico comprende poner en contacto la muestra con un agente de enlazamiento específico para la adiponectina enlazada a al menos un fragmento del receptor de adiponectina y el método comprende además la etapa de determinar si la adiponectina se enlaza a al menos un fragmento del

receptor de adiponectina.

12. El método de la reivindicación 1 en donde el fluido corporal es plasma sanguíneo o sangre entera.

13. El método de la reivindicación 1 en donde el fluido corporal es orina.

5 14. El método de la reivindicación 1 que comprende además determinar el nivel de adiponectina en una muestra biológica obtenida del sujeto y correlacionar el nivel de adiponectina con el avance de la condición, el inicio de la condición, o la eficacia del tratamiento de la condición.

15. El método de la reivindicación 1 que comprende además determinar el nivel de bikunina en una muestra biológica obtenida del sujeto y correlacionar el nivel de bikunina con el avance de la condición, el inicio de la condición, o la eficacia del tratamiento de la condición.

10 16. El método de la reivindicación 1 que comprende además determinar el nivel de proteína reactiva C en una muestra biológica obtenida del sujeto y correlacionar el nivel de proteína reactiva C con el avance de la condición, el inicio de la condición, o la eficacia del tratamiento de la condición.

15 17. El método de la reivindicación 1 que comprende determinar el nivel de glóbulos blancos en una muestra biológica obtenida del sujeto y correlacionar el nivel de glóbulos blancos con el avance de la condición, el inicio de la condición, o la eficacia del tratamiento de la condición.

18. El método de la reivindicación 1 que comprende además determinar el nivel del péptido C en una muestra biológica obtenida del sujeto y correlacionar el nivel del péptido C con el avance de la condición, el inicio de la enfermedad, o la eficacia de tratamiento de la condición.

19. El método de la reivindicación 18 en donde el tratamiento es la administración de un agonista de PPAR gamma.

20 20. El método de la reivindicación 1 en donde la enfermedad cardiovascular es insuficiencia cardíaca congestiva, infarto agudo de miocardio, enfermedad de la arteria coronaria, aterosclerosis, o isquemia.

21. El método de la reivindicación 1 para determinar si un sujeto que tiene arteriosclerosis es propenso a desarrollar enfermedad cardiovascular.

25 22. El método de la reivindicación 21 en donde la enfermedad cardiovascular es insuficiencia cardíaca congestiva, infarto agudo de miocardio, o isquemia.