

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 228**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2012 PCT/US2012/026141**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12141792**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2012 E 12771223 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2691534**

54 Título: **Fragmentos del extremo terminal C del receptor de adiponectina (CTF)-inmunoglobulina**

30 Prioridad:

11.04.2011 US 201161445103 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2017

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)**

**511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591-5098, US**

72 Inventor/es:

PUGIA, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 645 228 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

Fragmentos del extremo terminal C del receptor de adiponectina (CTF)-inmunoglobulina

Campo de la invención

5 El objeto de la presente invención se refiere en general a métodos, kits y agentes para la detección de Ig-CTF, así como para el diagnóstico, tratamiento y control de diabetes, cáncer y enfermedad hepática.

Antecedentes de la invención

10 La obesidad con inflamación crónica afecta a una población grande y creciente. Esta población tiene un alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes y con frecuencia desarrolla síndromes metabólicos asociados con la 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 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 células musculares de las grasas y la 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 están disminuidos en condiciones de obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Existen métodos para medir los niveles de adiponectina en sujetos para el pronóstico de estos y otros estados patológicos. Sin embargo, la medición de los niveles de adiponectina ha demostrado ser un indicador débil de la enfermedad. Subsiste la necesidad de mejores métodos de control de estados de enfermedad asociados con actividad anormal de los adipocitos. La presente invención resuelve esta y otras necesidades.

20 El receptor de adiponectina 1 (ADIPOR1) es un receptor acoplado a siete proteínas G transmembrana (GPCR). Véase, por ejemplo, los documentos WO 01/012662 y WO 01/090304. Muchos procesos biológicos médicamente significativos están mediados por rutas de transducción de señales que implican proteínas G [Lefkowitz, Nature 351, 353-354 (1991)]. Ciertos mensajeros extracelulares (ECM), que son fragmentos peptídicos del extremo terminal C de ADIPOR1, tienen valor diagnóstico en sangre humana. Su utilidad se confirmó utilizando un anticuerpo policlonal con un método de inmunoafinidad SELDI-TOF de medición de masa. Esas invenciones son el objeto de la solicitud relacionada WO 2007/120.311. El documento EP 1 870 710 A1 divulga un kit adecuado para detectar la presencia de inmunoglobulinas en una muestra biológica. No divulga un kit que sería adecuado para detectar Ig-CTF como distinto de Ig. El documento US 2010/143958 A1 divulga un método para detectar fragmentos solubles del extremo terminal C de ADIPOR1 y ADIPOR2.

Sumario

30 Se descubrió inesperadamente que los Fragmentos del extremo terminal C (CTF) de ADIPOR1 y ADIPOR2 (SEQ ID NO: 1 a 44) se integran covalentemente en las cadenas gamma y kappa de inmunoglobulina como parte de la estructura proteica. Además, se encontró que la CTF-inmunoglobulina estaba en el plasma, células y tejidos de pacientes y que los cambios en la CTF-inmunoglobulina se correlacionan con la resistencia a la insulina y el cáncer en pacientes. Por consiguiente, se encontró que la porción de CTF de CTF-inmunoglobulina reduce la respuesta de insulina celular provocando así la inhibición esperada del crecimiento celular y la reducción de la capacidad para reducir el nivel de glucosa en sangre.

40 Se encontró que la porción de CTF-inmunoglobulina-inmunoglobulina se une a antígenos en células, tejidos y sangre. La unión de los antígenos conduce a que Ig-CTF abandone el plasma y entre en las células y tejidos, inhibiendo el crecimiento celular y reduciendo la respuesta a la insulina. Por consiguiente, la porción de CTF-inmunoglobulina-inmunoglobulina y sus antígenos son útiles en métodos para determinar si CTF entra en células y tejido. Además, la porción de CTF-inmunoglobulina-inmunoglobulina y los antígenos unidos se pueden medir y utilizar para mejorar las mediciones de diagnóstico de CTF.

45 Se proporciona aquí un método para detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica, comprendiendo dicho método:

- a. exponer una muestra biológica derivada de un sujeto de una primera especie a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno del mismo, formando una mezcla;
- 50 b. exponer dicha mezcla a un segundo anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie; y
- c. detectar el Ig-CTF presente en dicha muestra.

También se proporciona un método para controlar el nivel del fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:

- a. detectar Ig-CTF en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- 5
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
 - c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra ya sea con
 - i. un estándar conocido; o
 - ii. la cantidad de IgG-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior en el tiempo.
- 10
- También se proporciona aquí un método para diagnosticar la resistencia a la insulina en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- 15
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
 - c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido; y
 - d. determinar si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con la resistencia a la insulina.
- 20
- También se proporciona un método para controlar la resistencia a la insulina en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
 - b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- 25
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra ya sea con
 - i. un estándar conocido; o
 - ii. la cantidad de Ig-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior en el tiempo; y
 - d. determinar si el nivel de Ig-CTF del sujeto es indicativo de progresión, regresión o estabilización de la resistencia a la insulina.
- 30
- Además, se proporciona aquí un método para diagnosticar cáncer en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- 35
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
 - c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido; y
 - d. determinar si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con cáncer.

Se proporciona además un método para controlar el cáncer en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:

- 5 a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra ya sea con
- 10 i. un estándar conocido; o
- ii. la cantidad de IgG-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior en el tiempo; y
- d. determinar si el nivel de Ig-CTF del sujeto es indicativo de progresión, regresión o estabilización del cáncer.

También se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad hepática en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:

- 15 a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido; y
- 20 d. determinar si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con enfermedad hepática.

También se proporciona un método para controlar la enfermedad hepática en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:

- 25 a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra ya sea con
- 30 i. un estándar conocido; o
- ii. la cantidad de Ig-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior en el tiempo; y
- d. determinar si el nivel de Ig-CTF del sujeto es indicativo de progresión, regresión o estabilización de enfermedad hepática en dicho sujeto.

Finalmente, también se proporciona un kit para detectar la presencia del fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica, que comprende:

- 35 a. un primer anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF de Ig producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (mAb 444-1D12); y/o un primer anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (mAb-515-4D6);
- 40 b. un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une preferentemente a Ig humana; y

c. instrucciones para el uso del primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno junto con un envase para el mismo.

5 En otro aspecto se proporcionan polipéptidos aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 (antígeno usado para hacer la línea celular que elabora el anticuerpo mAb 444-1D12 depositado en la ATCC el 21 de febrero de 2012 con el número de acceso PTA-2564), y la SEQ ID NO: 51 (antígeno usado para hacer la línea celular que elabora el anticuerpo mAb 515-4D6 depositado en la ATCC el 21 de febrero de 2012 con el número de acceso PTA-12563).

10 Se proporcionan además métodos para detectar Ig-CTF en una muestra biológica, comprendiendo dicho método exponer una muestra biológica derivada de un sujeto de una primera especie a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente a la Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión a antígeno del mismo, formando una mezcla, exponiendo la mezcla a un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie y detección del Ig-CTF presente en la muestra.

15 En algunas realizaciones, la primera especie, la segunda especie y la tercera especie no son la misma especie. En algunas realizaciones, el Ig-CTF comprende un fragmento del extremo terminal C de AdipoR1 unido covalentemente a una Ig. En algunas realizaciones, el fragmento del extremo terminal C de AdipoR1 comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. En algunas realizaciones, el Ig-CTF comprende un fragmento del extremo terminal C de AdipoR2 unido covalentemente a una Ig. En otras realizaciones adecuadas, el fragmento del extremo terminal C de AdipoR2 comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23-44. En algunas realizaciones, el Ig-CTF comprende un fragmento del extremo terminal C de AdipoR1 unido covalentemente a una Ig y un fragmento del extremo terminal C de AdipoR2 unido covalentemente a una Ig. En algunas realizaciones, la etapa de exponer una muestra biológica derivada del sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno del mismo abarca exponer la muestra biológica a más de uno de dicho primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF o fragmento de unión al antígeno de la primera especie.

30 En algunas realizaciones, la muestra biológica se deriva o se obtiene de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, glóbulos blancos, fluidos intersticiales o preparaciones histológicas. En realizaciones preferidas, la muestra biológica se deriva de sangre o plasma. Se puede añadir fluoruro, heparina o EDTA a la muestra biológica. El tejido puede ser de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, de músculo o de cerebro.

La muestra biológica puede derivarse de un mamífero y ese mamífero puede ser un humano, un primate no humano. Alternativamente, el mamífero puede ser un ratón, rata, cobaya, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo.

35 En algunas realizaciones, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido y ese soporte sólido puede ser una placa de inmunoensayo enzimático (EIA) o radioinmunoensayo (RIA).

40 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser un marcador radioactivo, un marcador de quimioluminiscencia, un marcador fluorescente, un marcador con epítipo, biotina, un marcador cromóforo, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL), o una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina).

45 En realizaciones adecuadas, el primer anticuerpo comprende: un anticuerpo aislado que se une preferiblemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (mAb 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (mAb-515-4D6). En algunas realizaciones, el primer anticuerpo comprende dos o más de estos anticuerpos.

50 En algunas realizaciones, la inmunoglobulina ("Ig") es IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. En realizaciones preferidas, la Ig es IgG. En otras realizaciones, la Ig es una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig es una cadena pesada gamma de IgG. En otra realización, la Ig es una región de unión al antígeno (Fab). En algunas realizaciones, la etapa de exponer la mezcla a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferiblemente a la Ig de la primera especie abarca exponer la mezcla a más de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. En otras realizaciones, los más de uno de dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie puede unirse a IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA, una cadena pesada gamma de IgG, una región de unión al antígeno (Fab) o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones preferidas, el CTF libre no está siendo detectado.

En algunas realizaciones, la resistencia a la insulina se asocia con tolerancia desmejorada a la glucosa, prediabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes tipo 3, diabetes juvenil, diabetes gestacional o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

- 5 En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, cáncer metastásico, cáncer de páncreas o carcinoma hepatocelular.

En algunas realizaciones, la enfermedad hepática es hepatitis autoinmune, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o hepatitis alcohólica.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Los dibujos adjuntos son no limitativos y se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de las realizaciones descritas en la presente memoria.

15 La Figura 1 ilustra un mecanismo propuesto de adiponectina sobre la respuesta del receptor de adiponectina. En pacientes normales, la adiponectina activa las rutas de señalización del receptor de adiponectina de AMPK MAPK p38 y PPAR α , causando glucólisis y oxidación de ácidos grasos en los músculos y retardando la producción de glucosa en el hígado. La adiponectina no se une directamente a los fragmentos del extremo terminal C de adiponectina o activa la liberación de CTF. En su lugar, la adiponectina bloquea la liberación del fragmento del extremo terminal C. Esto sensibiliza a las células a la insulina ya que CTF no se libera para inhibir la enzima de degradación de la insulina (IDE) en el hígado. Esto permite a IDE degradar la insulina intercelular que mantiene una respuesta más fuerte del receptor de insulina.

20 La Figura 2 ilustra la patología propuesta de la autoinmunidad de Ig-CTF. En pacientes anormales, la enzima convertidora del factor α de necrosis tumoral (TACE) escinde el CTF de los receptores de adiponectina que bloquea la adiponectina. Esta escisión permite la unión covalente de CTF a inmunoglobulinas atraídas a la región que rodea a los receptores de adiponectina. Las inmunoglobulinas están en células o circulan libremente. Una vez enlazado covalentemente, el Ig-CTF es absorbido en los tejidos. Esta absorción aumenta la concentración intercelular de CTF.
25 Esto desensibiliza las células a la insulina ya que CTF inhibe la enzima de degradación de la insulina (IDE) en el hígado. Esto evita que IDE degrade la insulina intercelular lo que provoca una respuesta más débil del receptor de insulina.

30 La Figura 3 muestra que CTF está unido a inmunoglobulinas. La Figura 3a muestra el resultado de la transferencia Western desnaturizada para el plasma de 3 pacientes humanos normales, 3 pacientes diabéticos y 3 pacientes con tolerancia a la glucosa alterada. El anticuerpo de CTF detecta bandas de diversos pesos moleculares que representan una inmunoglobulina unida covalentemente. Las transferencias de Western para las mismas muestras tratadas con condiciones básicas se muestran en la Figura 3b. Las bandas de CTF ya no son evidentes presumiblemente porque el enlace se ha roto. Estas mismas muestras se ensayaron en la Figura 3c con un anticuerpo anti-IgG para demostrar que la inmunoglobulina permanece.

35 La Figura 4 muestra ejemplos de imágenes del aumento de la absorción de IgG-CTF y CTF en el hígado, el cerebro y el páncreas en conejos que producen anticuerpos contra CTF.

Descripción detallada de formas de realización ilustrativas

Tal como se emplea más arriba y en toda la descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados.

40 Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente", cuando hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$, preferiblemente $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, aún más preferiblemente $\pm 1\%$, y todavía más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos y composiciones descritos.

Tal como se usa en el presente documento, CTF incluye secuencias de aminoácidos mostradas en la Tabla 1 y secuencias que tienen al menos 75%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95% de identidad con las mismas.

ES 2 645 228 T3

Tabla 1.

SEQ ID NO:	Denominación	Secuencia de Amino Ácidos
1	Fragmento 1 de AdipoR1	VLVAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
2	Fragmento 2 de AdipoR1	LVVAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
3	Fragmento 3 de AdipoR1	SNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
4	Fragmento 4 de AdipoR1	VVAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
5	Fragmento 5 de AdipoR1	VAAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
6	Fragmento 6 de AdipoR1	AAAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
7	Fragmento 7 de AdipoR1	AAFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
8	Fragmento 8 de AdipoR1	AFVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
9	Fragmento 9 de AdipoR1	FVHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
10	Fragmento 10 de AdipoR1	VHFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
11	Fragmento 11 de AdipoR1	HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
12	Fragmento 12 de AdipoR1	FYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
13	Fragmento 13 de AdipoR1	YGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
14	Fragmento 14 de AdipoR1	GVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
15	Fragmento 15 de AdipoR1	VSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL
16	Fragmento 16 de AdipoR1	NLQEFRYGLEGGCTDDTLL
17	Fragmento 17 de AdipoR1	LQEFRYGLEGGCTDDTLL
18	Fragmento 18 de AdipoR1	QEFRYGLEGGCTDDTLL
19	Fragmento 19 de AdipoR1	EFRYGLEGGCTDDTLL
20	Fragmento 20 de AdipoR1	FRYGLEGGCTDDTLL
21	Fragmento 21 de AdipoR1	RYGLEGGCTDDTLL
22	Fragmento 22 de AdipoR1	YGLEGGCTDDTLL
23	Fragmento 1 de AdipoR2	IFVVAGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
24	Fragmento 2 de AdipoR2	VAGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
25	Fragmento 3 de AdipoR2	SNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
26	Fragmento 4 de AdipoR2	FVVAGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
27	Fragmento 5 de AdipoR2	VVAGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL

ES 2 645 228 T3

28	Fragmento 6 de AdipoR2	AGAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
29	Fragmento 7 de AdipoR2	GAFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
30	Fragmento 8 de AdipoR2	AFVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
31	Fragmento 9 de AdipoR2	FVHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
32	Fragmento 10 de AdipoR2	VHFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
33	Fragmento 11 de AdipoR2	HFHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
34	Fragmento 12 de AdipoR2	FHGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
35	Fragmento 13 de AdipoR2	HGVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
36	Fragmento 14 de AdipoR2	GVSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
37	Fragmento 15 de AdipoR2	VSNLQEFRFMIGGGCSEEDAL
38	Fragmento 16 de AdipoR2	NLQEFRFMIGGGCSEEDAL
39	Fragmento 17 de AdipoR2	LQEFRFMIGGGCSEEDAL
40	Fragmento 18 de AdipoR2	QEFRFMIGGGCSEEDAL
41	Fragmento 19 de AdipoR2	EFRFMIGGGCSEEDAL
42	Fragmento 20 de AdipoR2	FRFMIGGGCSEEDAL
43	Fragmento 21 de AdipoR2	RFMIGGGCSEEDAL
44	Fragmento 22 de AdipoR2	FMIGGGCSEEDAL

5 Tal como se usa en la presente memoria, "cadena pesada gamma de inmunoglobulina" o "cadena ligera de inmunoglobulina" incluye la respectiva secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2 (no forma parte de la invención) y secuencias que tienen al menos 75%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de identidad, e incluso más preferiblemente al menos 98% o 99% de identidad con la misma.

Tabla 2 (no hace parte de la invención).

SEQ ID NO:	Cadena de inmunoglobulina	
45	Pesada gamma	MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CVASGFTFSS YPMTWVRQAP GKGLEWVASI SYDGSYKYKV DSMKGRLTIS RDNSKNTLYL EMNSLTAEDT AVYYCARTAF FNAYDFWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP

		SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL VGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
46	Ligera kappa	MRLPAQLLGL LMLWVPGSSG DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSDGNTYLNW FQQRPGQSPR RLIRVSNRD SGVPDRFSGS GSGTDFLKI SRVEAEDVGL YYCMQHTHWS PITFGQGTRL EIKR

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "inmunoglobulina" o "Ig" se refiere a un anticuerpo dirigido contra el antígeno que incluye la clase IgG, IgA, IgM, IgD e IgE y sus fragmentos que contienen una región de unión al antígeno (Fab), una cadena ligera kappa de inmunoglobulina, o una cadena pesada gamma de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO: 45 o 46 (no forma parte de la invención). Además, el término "inmunoglobulina" comprende inmunoglobulina de todas las especies que expresan el receptor de adiponectina, ya sea una inmunoglobulina nativa o modificada tal como anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales o anticuerpos recombinantes preparados con base en una secuencia homóloga.
- 10 Tal como se usa aquí, "unido" significa unión covalente por un enlace químico. Cuando se utiliza en referencia a Ig-CTF, "unido" se refiere a un enlace químico covalente entre un CTF que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 44 y una inmunoglobulina.
- 15 Por ejemplo, cuando se usa en referencia a Ig-CTF, el término "unido" incluye la unión de CTF que forma un éster o amida con un residuo en las SEQ ID NOs: 45 o 46 (no forma parte de la invención). Aunque no está relacionado con el mecanismo, se cree que la unión covalente tiene lugar después de que se forma un tioéster interno activado en CTF entre cisteína y glutamina en la secuencia peptídica (SEQ ID NOs: 1 a 44). Este tioéster activado es capaz de formar un enlace con la inmunoglobulina cuando la inmunoglobulina es llevada a la proximidad del tioéster. Se cree que este mecanismo de unión propuesto es similar al proceso de unión del complemento C3b a los antígenos que se produce a través de un tioéster interno como se muestra en:
- 20 Sim R.B. y Twose TM, R.C. The covalent-binding reaction of complement component C3 Biochem J 193; 115-27 (1981);
- Lutz H. U. y Stammler P. Preferential formation of C3b-IgG Complexes in vitro and in vivo from nascent C3b and naturally occurring anti-band 3 antibodies J Bio Chem 268, 17418-426, 1993; y
- 25 Sunh A y Pangburn MK. Covalent Attachment of Human Complement C3 to IgG J Bio Chem 269, 28997-29002, 1994.
- 30 Además, "unidos" a través de un mecanismo mediante el cual CTF se activa como un tioéster interno entre la cisteína y los ácidos glutámicos en la secuencia de CTF del péptido R1 (SEQ ID NO: 48) Glu-Gly-Gly-Cys-Thr-Asp-Asp-Thr-Leu-Leu (no forma parte de la invención). La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 se produce en muchas de las secuencias de AdipoR1 de CTF, tal como en las SEQ ID NOs: 1 a 22. En la secuencia de CTF de R2 (SEQ ID NO: 48), la secuencia de aminoácidos es Gly-Gly-Gly-Cys-Ser-Glu-Glu-Asp-Ala-Leu (no forma parte de la invención). La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 se produce en muchas de las secuencias de AdipoR2 de CTF, tales como en las SEQ ID NOs: 23 a 44.

Además, "unido" cuando se usa en referencia a Ig-CTF incluye la unión de CTF a través de un enlace éster con tirosina en la inmunoglobulina, por ejemplo, en las SEQ ID NOs: 45 o 46 (no forma parte de la invención).

5 Adicionalmente, "unido" cuando se usa en referencia a Ig-CTF incluye la unión de CTF a través de un enlace éster con una tirosina en posiciones de unión al complemento C3b en inmunoglobulina, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 45 o 46 (no forma parte de la invención), tal como en la posición 144 de la SEQ ID NO: 45.

Además, "unido" cuando se usa en referencia a Ig-CTF incluye la unión de CTF a través de un enlace éster con inmunoglobulina, por ejemplo, las SEQ ID Nos: 45 o 46 (no forma parte de la invención) en la región de unión al antígeno (Fab).

10 Además, "unido" cuando se usa en referencia a Ig-CTF incluye la unión de CTF a través de un enlace éster o amida con un residuo en la inmunoglobulina, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 45 o 46 (no forma parte de la invención).

15 Además, "unido" puede significar otros medios de unión de dos péptidos o proteínas. Algunos reactivos de entrecruzamiento comúnmente utilizados incluyen: glutaraldehído que une moléculas peptídicas al extremo terminal N de otro péptido; carbodiimidias (EDC) que une un péptido al extremo terminal C de otro péptido; ésteres de succinimida (por ejemplo, MBS, SMCC) que se unen a grupos amino libres y residuos de Cys; bencidina (BDB que se une a residuos de Tyr; peryodato que se une con grupos de carbohidrato a péptidos e isotiocianatos, triazoles y otros métodos adecuados se describen generalmente, por ejemplo, en:

L. A. Carpino "1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive," J. Am. Chem. Soc. 115 (10): 4397-4398 (1993);

20 C. Niemeyer, *Bio conjugation Protocols: Strategies and Methods* Humana Press, 2004, 344 pp., tapa dura; O'Sullivan, M.J., y Marks, V., *Meth. Enzymol.*, 73, 147-166 (1981).

Harlow, E., y Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY: 1988) Capítulo 9, p. 349.

25 Además, "unido" incluye por medio de un brazo enlazador tal como una cadena lineal de seis carbonos, tal como BS-3 que es un enlazador homo-bifuncional o MSH que es un enlazador hetero-bifuncional. Ambos contienen un grupo hexametileno, -CH₆-, para formar un espacio de 7,5 Angstroms entre el péptido y la proteína portadora. La ventaja de estos enlazadores es que la distancia de un espaciador de 7,5 Angstrom permite que los péptidos conjugados sobresalgan de la superficie de la proteína portadora, en comparación con los métodos tradicionales de uso de glutaraldehído que no tiene ningún espaciador. Por lo tanto, el péptido es más accesible para ser antigénico. El enlace covalente entre el péptido y la proteína portadora es muy estable, lo que hace improbable el desprendimiento durante el procedimiento de inmunización normal.

30 Además, "unido" incluye por medio de un sitio de conjugación que puede estar en el extremo terminal N o C o en el centro de la secuencia. El punto de conjugación puede ser un grupo sulfhidrilo (SH) o un grupo amino (NH₂). Un enlazador homo-bifuncional es para enlazar un péptido y una proteína a través de Lys en ambos lados. Mientras que un enlazador hetero-bifuncional es para enlazar un péptido a través de Cys y una proteína a través de Lys o el extremo terminal N.

35 Además, "unido" por otros medios es una reacción de acoplamiento que produce un "conjugado" entre un CTF de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 44 y un residuo en los CTF de las SEQ ID NOs: 45 a 46 (no forma parte de la invención) que se asemeja a la proteína de CTF-inmunoglobulina nativa, por lo tanto, factores tales como la localización de una secuencia de residuos dentro de una proteína determinará dónde se debe enlazar el portador. Además, la composición del inmunógeno debe ser considerada ya que diferentes técnicas requieren una química específica. Los métodos comunes de acoplamiento unirán a portadores con antígenos a través de grupos amino, ácido carboxílico o sulfhidrilo libres.

40 Tal como se usa en la presente memoria, "porcentaje de identidad" se refiere a la proporción de la secuencia polipeptídica que coincide con la secuencia polipeptídica de referencia y puede determinarse comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en la que la secuencia polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones, supresiones (es decir, huecos), formación de derivados y/o sustituciones conservadoras de aminoácidos 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 emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. La identidad se evalúa utilizando cualquiera de la variedad de algoritmos y programas de comparación de secuencias conocidos en la técnica. Tales algoritmos y programas incluyen, pero no se limitan de

manera alguna, a TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, CLUSTALW, FASTDB. Véase, también, Pearson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403410, 1990; Thompson, et al., Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680, 1994; Higgins, et al., Meth. Enzymol., 266: 383402, 1996; Altschul et al., Nature Genetics, 3: 266-272, 1993; Brutlag, et al., Comp. App. Biosci., 6: 237-44, 1990.

5 Tal como se usa en la presente memoria, la "formación de derivados" se refiere al proceso de modificar químicamente mediante técnicas tales como ubiquitinación, marcación, pegilación (es decir, derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución química de aminoácidos, tales como ornitina, que normalmente no ocurre en las proteínas humanas.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro que tiene estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, o una treonina por una serina.

15 Tal como se usa en la presente memoria, "polipéptido", "péptido", "cadena" y "fragmento de proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos incluyen polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos que no se producen naturalmente.

20 Tal como se usa en el presente documento, "CTF-inmunoglobulina" o "Ig-CTF" se refiere a un péptido de CTF unido a inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina (por ejemplo, Fab). Por ejemplo, el CTF puede estar unido a una inmunoglobulina en una cadena pesada gamma con al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 45 (no forma parte de la invención) o una cadena ligera kappa con al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 46 (no forma parte de la invención). El CTF tiene al menos un 75% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 44. En ciertos casos, el CTF y la inmunoglobulina, útiles en los métodos, composiciones y kits no tienen la secuencia exacta como se describe aquí, pero están presentes como una forma variante con sustitución y/o derivatización conservadora de aminoácidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el CTF puede estar sustituido en al menos 5%, al menos 10%, o incluso al menos 25% de sus aminoácidos sin tener una pérdida de función. Por consiguiente, al menos algunos de los aminoácidos en los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 46, pueden estar sustituidos por otros aminoácidos. En realizaciones particulares, Ig-CTF se refiere a un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico

- aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo de polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo de polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; un complejo polipeptídico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 46; o cualquier combinación de los mismos.
- Las inmunoglobulinas útiles en la invención pueden producirse de forma recombinante, mediante hibridomas monoclonales o aislados biológicamente de su entorno natural, por ejemplo, a partir de células, animales o seres humanos. Por ejemplo, las células productoras de anticuerpos se fusionan con células que crecen continuamente en cultivo para formar hibridomas. Un solo hibridoma produce solamente un anticuerpo. Un solo hibridoma se divide para producir una gran población de "clones", todos fabricando el mismo anticuerpo "monoclonal". Los hibridomas vivos pueden congelarse indefinidamente en nitrógeno líquido. Se proporcionan anticuerpos preferidos que se unen preferentemente a CTF ya sea como CTF libre o como la porción CTF de Ig-CTF. En realizaciones particulares se proporcionan anticuerpos que se unen preferentemente a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 (no forma parte de la invención) (antígeno usado para elaborar 461-4H11); un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 (no forma parte de la invención) (antígeno usado para elaborar 444-1D12); un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 (no forma parte de la invención) (antígeno usado para elaborar 515-4D6); o un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 (no forma parte de la invención) (antígeno usado para elaborar 510-6B6).
- Tal como se utiliza en la presente memoria, "antígeno de CTF-inmunoglobulina" se define como una molécula, sustancia, proteína o péptido que es reconocido por o unido a la CTF-inmunoglobulina y se aísla biológicamente de células, animales y seres humanos que producen CTF-inmunoglobulina. Además, este "antígeno de la CTF-inmunoglobulina" sería fabricado por todas las especies que producen CTF-inmunoglobulina y puede ser antígenos

en células, en tejidos o libres en fluidos corporales tales como orina, sangre, líquido cefalorraquídeo (CSF) o fluido intersticial.

5 El "CTF" y el "antígeno para CTF-inmunoglobulina" se pueden aislar a partir de material biológico o se pueden preparar de forma recombinante, o preferiblemente como péptidos mediante métodos convencionales sintéticos de síntesis en fase líquida o en fase sólida, usando técnicas manuales o automatizadas. Los métodos adecuados se describen generalmente, por ejemplo, en:

Atherton, E. y Sheppard, R.C., *Solid Phase peptide synthesis: a practical approach*. Oxford, England: IRL Press (1989);

10 Stewart, J.M. y Young, J.D., *Solid phase peptide synthesis*, 2a edición, Rockford: Pierce Chemical Company, 91 (1984);

R. B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide," *J. Am. Chem. Soc.* 85 (14): 2149-2154 (1963); y

15 L. A. Carpino "1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive," *J. Am. Chem. Soc.* 115 (10): 4397-4398 (1993). Además, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos de los péptidos puede ser alterada durante la síntesis directa y/o combinada usando métodos químicos con secuencias o con otras proteínas para producir una variante de péptido.

20 Como se usa en la presente memoria, "se une preferentemente" significa que un anticuerpo se une a un objetivo, pero también puede unirse a un número limitado de otras moléculas. La "unión preferencial" cuando se usa en el contexto de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, representa la unión a través de dominios codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina a uno o más epítopos de una proteína de interés, sin favorecer la unión a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas.

25 Preferiblemente, los péptidos se preparan por metodología convencional de síntesis de péptidos en fase sólida. Pueden utilizarse protocolos de síntesis estándar basados en la química Fmoc. Después de la síntesis, los péptidos en bruto se separan del soporte sólido y se eliminan los grupos protectores de la cadena lateral. Los péptidos en bruto se pueden purificar, por ejemplo, mediante cromatografía líquida preparativa de alta resolución, tal como HPLC de fase inversa C18. El péptido purificado se puede desalar adicionalmente mediante HPLC y liofilizar hasta la forma seca. Preferiblemente, los péptidos se almacenan en recipientes sellados bajo atmósfera de nitrógeno.

30 Todas las formas de los péptidos de las SEQ ID NOs: 1 a NO: 46, incluyendo el ácido libre, la base libre, la forma zwitteriónica, las formas cristalinas isomórficas, todas las formas quirales, enantioméricas, racémicas, hidratos, solvatos, sales e hidratos de sales ácidas, se contempla que están dentro del alcance de la materia descrita en este documento. El ácido libre y las sales de sodio, potasio y calcio son las formas preferidas.

35 De acuerdo con el objeto descrito en la presente memoria, los péptidos de las SEQ ID NOs: 1 a NO: 46 pueden contener uno o más átomos de carbono sustituidos asimétricamente, y pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. De este modo, se pretende que todas las formas quirales, diastereoméricas, racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica o forma isomérica específica. Es bien conocido en la técnica cómo preparar y aislar tales formas ópticamente activas. Por ejemplo, las mezclas de estereoisómeros se pueden separar por técnicas estándar incluyendo, pero no limitadas a, resolución de formas racémicas, cromatografía normal, de fase inversa y quiral, formación preferencial de sales, recristalización y similares, o por síntesis quiral ya sea a partir de materiales de partida quirales o por síntesis deliberada de los centros quirales objetivo.

40 Como se comprenderá fácilmente, los grupos funcionales presentes pueden contener grupos protectores durante el transcurso de la síntesis. Los grupos protectores son conocidos per se como grupos funcionales químicos que pueden ser añadidos y eliminados selectivamente de grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo y grupos carboxilo. Estos grupos están presentes en un compuesto químico para volver tal grupo funcional inerte a las condiciones de reacción químicas a las que se expone el compuesto. Cualquiera de una variedad de grupos protectores se puede emplear con la presente invención. Los grupos protectores preferidos incluyen el grupo benciloxicarbonilo y el grupo terc-butiloxicarbonilo. Otros grupos protectores preferidos que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención se pueden describir en Greene, T.W. y Wuts, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis* 2a. Ed., Wiley & Sons, 1991.

50 Tal como se usa en la presente memoria, "tratar" se refiere al tratamiento preventivo, curativo y paliativo de una afección, y requiere mínimamente un efecto paliativo. Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a cualquier éxito o indicios de éxito en la atenuación o mejoría de una lesión, patología o condición, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión, disminución de síntomas o hacer la condición más

tolerable al paciente, retardando la tasa de degeneración o declive, haciendo que el punto final de degeneración sea menos debilitante, mejorando el bienestar físico o mental del sujeto, o prolongando la duración de la supervivencia. El tratamiento puede evaluarse mediante parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico, examen neurológico o evaluaciones psiquiátricas.

- 5 El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una colección de fluidos, células o tejidos similares (por ejemplo, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, incluyendo aspiración con aguja fina), aislados de un sujeto, así como fluidos, células, o tejidos presentes dentro de un sujeto. En algunas realizaciones la muestra es un fluido biológico. Los fluidos biológicos son típicamente líquidos a temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos naturales presentes en, extraídos de, expresados o bien extraídos de un sujeto o
- 10 fuente biológica. Ciertos fluidos biológicos se derivan de determinados tejidos, órganos o regiones localizadas y ciertos otros fluidos biológicos pueden estar situados más global o sistémicamente en un sujeto o fuente biológica. Ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, linfa, orina, saliva, líquido quístico, gotas de lágrimas, heces, esputo, secreciones mucosas de los tejidos y órganos secretores, secreciones vaginales, fluidos ascíticos tales como aquellos asociados con tumores no sólidos, fluidos de las cavidades pleural, pericárdica, peritoneal, abdominal y otras cavidades corporales, fluidos recogidos por lavado bronquial y similares. Los fluidos biológicos también pueden incluir soluciones líquidas en contacto con un sujeto o fuente biológica, por ejemplo, medio de cultivo de células y órganos que incluye medio acondicionado de células u órganos, fluidos de lavado y similares. El término "muestra", tal como se utiliza en la presente memoria, abarca materiales retirados de un sujeto o materiales presentes en un sujeto.
- 15
- 20 El término "progresión", tal como se utiliza en el contexto de progresión de una condición, incluye el cambio de la condición de un estado menos grave a un estado más severo o avanzado.
- El término "regresión", tal como se utiliza en el contexto de la regresión de una condición, incluye el cambio de la condición de un estado más grave a un estado menos grave o avanzado.
- 25 El término "estable" tal como se utiliza en el contexto de una condición estable, está destinado a describir una condición de enfermedad que no ha cambiado o no ha cambiado significativamente durante un período de tiempo clínicamente relevante para ser considerada una condición progresiva o una enfermedad progresiva o una condición de regresión.
- Tal como se usa aquí, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente para referirse a un animal, incluyendo un mamífero, preferiblemente un ser humano.
- 30 Tal como se usa en la presente memoria, "sano" se refiere a un paciente que actualmente no sufre de una afección o enfermedad e incluye un paciente que está predispuesto a sufrir una afección.
- Tal como se usa en la presente memoria, "diagnóstico" o "diagnosticar" se refiere a la identificación de pacientes con una condición, tal como resistencia a la insulina, crecimiento celular anormal o enfermedad hepática. "Diagnóstico" o "diagnosticar" también se refiere a la identificación de los pacientes que necesitan tratamiento. En algunas realizaciones, la resistencia a la insulina está asociada con tolerancia alterada a la glucosa, prediabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes tipo 3, diabetes juvenil o diabetes gestacional. En algunas realizaciones, el crecimiento celular anormal es cáncer, tal como, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer metastásico, cáncer de páncreas o carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, la enfermedad del hígado es hepatitis autoinmune, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o hepatitis alcohólica.
- 35
- 40 Tal como se usa en la presente memoria, "diabetes" se refiere a diabetes mellitus, una hiperglucemia crónica debida a secreción y/o acción defectuosa de insulina. La Organización Mundial de la Salud reconoce tres formas principales de diabetes mellitus: diabetes tipo I, tipo II, tipo 3, diabetes juvenil y diabetes gestacional. Aunque todas las formas se deben a que las células beta del páncreas no pueden producir suficiente insulina para prevenir la hiperglucemia, las causas son diferentes. La diabetes tipo I se debe generalmente a la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas. La diabetes tipo II se caracteriza por la resistencia a la insulina en tejidos objetivo, lo que crea una necesidad de cantidades anormalmente altas de insulina y la diabetes se desarrolla cuando las células beta no pueden satisfacer esta demanda. La diabetes gestacional es similar a la diabetes tipo II en que implica resistencia a la insulina; las hormonas del embarazo pueden causar resistencia a la insulina en las mujeres genéticamente predispuestas a desarrollar esta condición. La diabetes gestacional típicamente se resuelve con el parto del niño, sin embargo, la diabetes tipo I y II son condiciones crónicas. Todos los tipos son tratables con insulina. La diabetes tipo I, en la que la insulina no es secretada por el páncreas, es directamente tratable sólo con insulina inyectada o inhalada, aunque la dieta y otros ajustes de estilo de vida son parte del manejo. El tipo II puede ser manejado con una combinación de tratamiento dietético, comprimidos e inyecciones y, con frecuencia, suplementos de insulina.
- 45
- 50

Tal como se utiliza en la presente memoria, "enfermedad cardiovascular" se refiere a cualquier enfermedad que afecte al corazón y a los recipientes sanguíneos, incluyendo enfermedades relacionadas con la aterosclerosis (enfermedad arterial) que pueden causar ataques cardíacos y ciertos tipos de accidentes cerebrovasculares.

5 Tal como se usa en la presente memoria, "resistencia a la insulina" se refiere a la disminución en un individuo en la acción biológica de la insulina *in vivo* según se evalúa por la velocidad de eliminación de la glucosa del torrente sanguíneo (por ejemplo, en un tejido sensible a la insulina, tal como músculo, grasa e hígado). La resistencia a la insulina se produce en pacientes con diabetes, enfermedad cardiovascular, actividad anormal de los adipocitos y síndrome metabólico. Para ciertas realizaciones, "resistencia a la insulina" se refiere a la inhibición del CTF de la enzima de degradación de la insulina (IDE) que aumenta la insulina intercelular y reduce la respuesta del receptor de insulina (Figura 1). La "resistencia a la insulina" también se refiere a la inhibición de la enzima de degradación de la insulina que evita la degradación del amiloide beta que conduce a los depósitos asociados con la enfermedad de Alzheimer. En otras realizaciones, la resistencia a la "resistencia a la insulina" por antígenos en células normales es dirigida por CTF-inmunoglobulina que conduce al transporte activo de CTF-inmunoglobulina del plasma a las células para la utilización de CTF como inhibidor de IDE (Figura 2).

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, "crecimiento celular anómalo" se refiere al aumento del crecimiento celular en un individuo con cáncer o enfermedad inflamatoria según se evalúa por la proliferación celular y crecimiento celular anormal. En algunas realizaciones, el "crecimiento celular anormal" se reduce por "resistencia a la insulina" debido a la respuesta reducida del receptor de insulina y los pacientes con "crecimiento celular anormal" tienen niveles de CTF-inmunoglobulina. Para otras realizaciones, el "crecimiento anormal de células" ocurre cuando CTF inhibe la enzima ADAM-17 y está asociado con mayor cantidad de TNF-alfa y HER2/neu en el paciente. Para otras realizaciones, CTF-inmunoglobulina es un mecanismo para inhibir el crecimiento celular en células anormales (tales como células precancerosas o envejecidas en las que el crecimiento es retardado por resistencia a la insulina y células anormales dirigidas por antígenos que diferencian una célula anormal de una normal).

25 Tal como se usa en la presente memoria, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un juicio médico acertado, adecuadas para el contacto con tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas acordes con a una relación razonable beneficio/riesgo.

30 Tal como se usa en la presente memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto precursor se modifica elaborando sales de ácido o de base de los mismos, incluyendo sales de adición de ácido y sales de adición de bases. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. El término "sal de adición de ácido" se refiere al correspondiente derivado de sal de un compuesto precursor que se ha preparado por adición de un ácido.

35 Tal como se usa en la presente memoria, se entiende que "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

40 Tal como se usa en el presente documento, "unidad de dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el paciente particular a tratar. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada del compuesto o compuestos activos calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención puede ser dictada por (a) las características únicas del compuesto o compuestos activos y el efecto terapéutico particular que se ha de alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la mezcla de tales compuestos activos.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del ingrediente activo como se describe en la presente memoria que puede ser eficaz para prevenir, reducir o eliminar los síntomas o la condición y, con respecto a esta invención, incluyendo tratar la resistencia a la insulina y crecimiento celular anormal.

50 En general, la cantidad eficaz de los fragmentos de CTF de la invención oscila entre aproximadamente 0,25 mg por kg de peso del paciente y aproximadamente 200 mg por kg de peso del paciente, preferiblemente aproximadamente 25 mg por kg de peso del paciente hasta aproximadamente 175 mg por kg de peso del paciente y más preferiblemente aproximadamente 30 mg por kg de peso del paciente hasta aproximadamente 150 mg por kg de peso del paciente (y todas las combinaciones y subcombinaciones posibles).

También se han descubierto las composiciones útiles, formas de dosificación y kits de CTF-inmunoglobulina. Por lo tanto, se proporcionan aquí composiciones farmacéuticas de Ig-CTF. En algunas realizaciones, el Ig-CTF está en forma de sales farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de Ig-CTF comprende Ig-CTF y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica de Ig-CTF está en una forma de dosificación inyectable, parenteral, infundible o inhalable. En algunas realizaciones, se proporcionan kits que comprenden el Ig-CTF o una composición farmacéutica del mismo e instrucciones para su administración.

En ciertas realizaciones de la invención, el péptido o su sal farmacéuticamente aceptable se administra por vía parenteral. En ciertas realizaciones preferidas, el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra mediante inyección. En otras realizaciones preferidas, el péptido o su sal farmacéuticamente aceptable se administra por infusión. En aún otras realizaciones preferidas, el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por inhalación.

Por "molécula informadora", 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 del anticuerpo unido al antígeno. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. La molécula informadora más comúnmente usada en este tipo de ensayo son partículas de látex coloreadas, partículas de metal, enzimas, fluoróforos o moléculas que contienen radionúclidos (es decir, radioisótopos).

Las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva no están limitadas a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar.

20 Detección y control de Ig-CTF

La presente invención proporciona métodos para detectar Ig-CTF. En una realización, una muestra biológica derivada de un sujeto de una primera especie se expone a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión a antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone entonces a un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Entonces se detecta el Ig-CTF presente en la muestra. Existen muchas plataformas de ensayo diferentes que podrían utilizarse para detectar el Ig-CTF.

En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: la SEQ ID NO: 49, HVLVVAADFVHFCYS, (no forma parte de la invención), la SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFYRGLGEGCTDDSL (no forma parte de la invención), la SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y la SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias son reconocidas por los anticuerpos depositados: clon 444-1D12, y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoensayos turbidimétricos, inmunoensayos nefrométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunolectroforesis en gel coquete o inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

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

A modo de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y se pone en contacto una muestra de ensayo biológico de

- un paciente con la molécula unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.
- Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia western cuantitativa, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.
- El Ig-CTF se puede detectar por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).
- El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento de extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye al adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.
- En los métodos de la presente invención, la muestra biológica puede provenir de varias fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, líquido intersticial o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.
- En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para su almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.
- En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o de cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).
- Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde los mamíferos son seres humanos. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, investigación y animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo pueden ser fuentes potenciales de muestras biológicas.
- En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían usarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.
- En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poliacrilamida, el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y

generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

5 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

15 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Se puede unir una enzima tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa o ureasa, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

20 En otras realizaciones, el CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

En otra realización, la primera especie, la segunda especie y la tercera especie no son la misma especie.

25 En algunas realizaciones, es deseable controlar los niveles de Ig-CTF y no sólo detectarlo. También se proporcionan métodos para controlar el nivel de Ig-CTF. En una realización, una muestra biológica obtenida de un sujeto de una primera especie se expone a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión a antígeno de ese primer anticuerpo y esto forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone entonces a un segundo anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. A continuación, se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra y luego se compara la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido, o con la cantidad de Ig-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior en el tiempo. En otra realización, esta comparación puede mostrar si el Ig-CTF ha aumentado, disminuido o se ha estabilizado en el tiempo. Existen muchas plataformas de ensayo diferentes que podrían usarse para controlar los niveles de Ig-CTF.

35 En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble, se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al cual una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias son reconocidas por los anticuerpos depositados: clon 444-1D12, y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía,

inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

5 Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF está alterado comparado con niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para su desempeño.

10 A título de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza 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 unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que se añaden simultáneamente tanto la muestra como el anticuerpo marcado al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.

25 Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia western de tipo cuantitativo, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.

30 El CTF-inmunoglobulina se puede controlar por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas de acoplador de rejilla o interferometría).

35 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen la secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) del Ig-CTF. Por ejemplo, cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.

40 En los métodos de la presente invención, la muestra biológica puede provenir de una serie de fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, 45 biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, fluidos intersticiales o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.

En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para su almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.

50 En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).

Las muestras biológicas se pueden derivar de cualquier mamífero. En una realización preferida, la muestra se obtiene a partir de un ser humano. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y animales domésticos (mascotas) como el ratón, la rata, el conejillo de indias, el hámster, el perro, el gato, la oveja, la vaca, el caballo, el burro, la mula o el cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.

5 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían usarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

10 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poliacrilamida, el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

15 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de
20 Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

25 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.
35
40

En otras realizaciones, CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

En otra realización, la primera especie, la segunda especie y la tercera especie no son la misma especie.

45 La presente invención también proporciona kits para detectar la presencia de Ig-CTF en una muestra biológica, que comprende un primer anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (mAb 444-1D12), y/o un primer anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-12563 (mAb-515-4D6), un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une preferentemente a Ig humana e instrucciones para el uso del primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno junto con un envase para el mismo.
50

55 En una realización preferida, la Ig en Ig-CTF, es IgG. En otra realización preferida, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

En una realización de la invención, el kit también contiene un recipiente para contener el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Por ejemplo, el recipiente puede ser un tubo de 1,5 mL, un tubo de 5 mL, un tubo de 15 mL, un tubo de 25 mL o un tubo de 50 mL. Estos tubos pueden estar hechos de materiales tales como policarbonato, plásticos o vidrio. En otra realización de la invención, el kit también contiene un recipiente para contener el segundo anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno cuando no está en uso. Por ejemplo, el recipiente puede ser un tubo de 1,5 mL, un tubo de 5 mL, un tubo de 15 mL, un tubo de 25 mL o un tubo de 50 mL. Estos tubos pueden estar hechos de materiales tales como policarbonato, plásticos o vidrio.

En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poli(acrilamida), el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

Uso de Ig-CTF en el diagnóstico, tratamiento y control de la resistencia a la insulina

Una realización de la invención se proporciona un método para diagnosticar la resistencia a la insulina en un sujeto. En una realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Luego se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. Finalmente, la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra se compara con un estándar conocido y se determina si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con la resistencia a la insulina.

Como ejemplos, la resistencia a la insulina puede estar asociada con tolerancia alterada a la glucosa, prediabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes tipo 3, diabetes juvenil, diabetes gestacional o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFYRGLGEGGCTDDSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias se reconocen con los anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos in situ pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

- 5 Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF está alterado en comparación con los niveles normales detectables en los no-enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para su desempeño.
- 10 A título de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo contra el fragmento se inmoviliza sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y se pone en contacto una muestra de ensayo biológico de un paciente con la molécula unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.
- 15 Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia Western de tipo cuantitativo, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.
- 20 El CTF-inmunoglobulina se puede detectar por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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, absorbanza, reflectancia, transmitancia y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).
- 25 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye el receptor 1 de adiponectina (adiporreceptor 1; "AdipoR1") y el receptor 2 de adiponectina (adiporreceptor 2; "AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23-44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.
- 30 En los métodos descritos en el presente documento, la muestra biológica puede provenir de un cierto número de fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecaado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, fluidos intersticiales o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.
- 35 En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para su almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.
- 40 En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).
- 45 Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde el mamífero es humano. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.
- 50 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían utilizarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea
- 55

celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

5 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poli(acrilamida), el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y
10 generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas epsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ¹²⁵I, que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

40 En otras realizaciones, CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

Otra realización de la invención proporciona un método para tratar la resistencia a la insulina en un sujeto. En una realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Entonces se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. Por último, se compara la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido y se determina si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con la resistencia a la insulina y la administración al sujeto, o se prescribe, un tratamiento para la resistencia a la insulina.

Como ejemplos, la resistencia a la insulina puede estar asociada con tolerancia alterada a la glucosa, prediabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes tipo 3, diabetes juvenil, diabetes gestacional o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

55 En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias son reconocidas por los anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

15 Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF se altera en comparación con los niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para su desempeño.

25 A modo de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y se pone en contacto una muestra de ensayo biológico de un paciente con la molécula unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.

35 Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia western cuantitativa, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.

40 El CTF-inmunoglobulina se puede detectar por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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, absorbanza, reflectancia, transmitancia y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).

50 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye al adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.

55 En los métodos de la presente invención, la muestra biológica puede provenir de varias fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, líquido intersticial o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.

En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para su almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.

En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).

5 Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde los mamíferos son seres humanos. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.

10 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían utilizarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

15 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poli(acrilamida), el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

25 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

35 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador de epítipo, biotina, un marcador cromóforo, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ¹²⁵I, que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

En otras realizaciones, CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

50 Ejemplos de tratamientos para la resistencia a la insulina incluyen reducir la necesidad de insulina, aumentar la sensibilidad de las células a la acción de la insulina o suplementar la insulina. La reducción de la necesidad de insulina puede ocurrir, por ejemplo, a través de cambios en la dieta. El aumento de la sensibilidad de las células a la acción de la insulina puede ocurrir, por ejemplo, tomando medicamentos como Glucófono, pioglitazona y rosiglitazona. La suplementación de insulina puede producirse, por ejemplo, introduciendo insulina en el sujeto.

5 Otra realización de la invención proporciona un método para tratar la resistencia a la insulina en un sujeto. En una
 10 realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie
 que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer
 anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta
 mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie
 que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de
 lavado opcional. Luego se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. Finalmente, se compara la cantidad de Ig-
 CTF presente en la muestra con un estándar conocido y se determina si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae
 dentro del nivel de Ig-CTF asociado con resistencia a la insulina y se administra al sujeto, o se prescribe, un
 tratamiento para resistencia a la insulina.

Como ejemplos, la resistencia a la insulina puede estar asociada con tolerancia alterada a la glucosa, prediabetes,
 diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes tipo 3, diabetes juvenil, diabetes gestacional o esteatohepatitis no
 alcohólica (NASH).

15 En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se
 ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión.
 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada
 20 para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados:
 SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50,
 HFYGVSNLQEFYRGLGEGCTDDSSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma
 parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones
 preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias se reconocen con los
 anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una
 25 muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección
 empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica
 reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo,
 inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA),
 30 inmunoturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía,
 inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o
 inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una
 muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF está alterado en comparación
 35 con los niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso
 particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El
 inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la
 enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a
 todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para
 su desempeño.

40 A título de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza
 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 unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo
 suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo
 anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente
 45 tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y
 la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los
 resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por
 comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este
 ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden
 50 simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar
 se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien
 conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones serán fácilmente evidentes.

Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia Western de tipo cuantitativo, inmunohistoquímica,
 biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.

55 El CTF-inmunoglobulina puede ser detectado por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que
 pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).

5 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye al adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y al adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.

10 En los métodos descritos en la presente invención, la muestra biológica puede provenir de un cierto número de fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, líquido intersticial o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.

15 En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para el almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.

20 En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).

Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde los mamíferos son seres humanos. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.

25 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían usarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

30 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poliacrilamida, el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

35 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas epsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

40 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, o anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína o rodamina pueden ser útiles en la invención. Los anticuerpos fluorescentes útiles se

5 pueden obtener comercialmente, por ejemplo, a través de Tago Immunologicals (Burlingame, CA). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

En otras realizaciones, el CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

15 En otra realización de las invenciones, el estándar conocido puede ser el nivel de Ig-CTF de sujetos que son identificados como que tienen una sensibilidad normal a la insulina. En otra realización de la invención, el estándar conocido puede ser el nivel de Ig-CTF de sujetos que se identifican como resistentes a la insulina. En otra realización de la invención, el estándar conocido puede ser el nivel de Ig-CTF de sujetos que son identificados como diabéticos. En otra realización de la invención, la muestra biológica mencionada en la etapa se obtiene a partir de dicho sujeto después del tratamiento para la resistencia a la insulina o la diabetes o la muestra biológica se obtiene del sujeto en un momento anterior se obtiene del sujeto después del tratamiento para la resistencia a la insulina o diabetes.

20 Uso de Ig-CTF en el diagnóstico, tratamiento y control del cáncer

25 Otra realización proporcionada aquí son métodos para diagnosticar cáncer en un sujeto. En una realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Entonces se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. Finalmente, la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra se compara con un estándar conocido y se determina si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con cáncer.

30 Como ejemplos, el cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer metastásico, carcinoma hepatocelular o cáncer de páncreas.

35 En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFYRGLGEGCTDDSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias se reconocen con los anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

40 45 50 55 Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF está alterado en comparación con los niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para su desempeño.

- 5 A modo de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y se pone en contacto una muestra de ensayo biológico de un paciente con la molécula unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.
- 10 Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia Western de tipo cuantitativo, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.
- 15 El CTF-inmunoglobulina puede ser detectado por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).
- 20 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.
- 25 En los métodos descritos en el presente documento, la muestra biológica puede provenir de un cierto número de fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, líquido intersticial o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.
- 30 En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para el almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.
- 35 En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).
- 40 Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde el mamífero es humano. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.
- 45 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían utilizarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.
- 50 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poliácridamida, el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y
- 55

generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

5 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

15 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

20 En otras realizaciones, el CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

35 Otra realización de la invención proporcionada es un método para tratar el cáncer en un sujeto. En una realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Luego se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. Por último, se compara la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido y se determina si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con cáncer y se administra al sujeto, o prescribe, un tratamiento para el cáncer.

40 Como ejemplos, el cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer metastásico, carcinoma hepatocelular o cáncer de páncreas.

45 En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFYRGLGEGGCTDDSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias se reconocen con los anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía,

inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

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

10 A modo de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza 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 unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.

25 Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia Western de tipo cuantitativo, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.

30 El CTF-inmunoglobulina puede ser detectado por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).

35 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.

40 En los métodos de la presente invención, la muestra biológica puede provenir de varias fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, líquido intersticial o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.

En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.

50 En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).

Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde el mamífero es humano. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.

5 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían utilizarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

10 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poliacrilamida, el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

15 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

25 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

En otras realizaciones, CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

45 Ejemplos de tratamientos contra el cáncer incluyen cirugía, terapia hormonal, radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida y combinaciones de los mismos. Ejemplos de fármacos de terapia hormonal incluyen inhibidores de la aromatasa y análogos e inhibidores de la hormona liberadora de la hormona luteinizante. Ejemplos de tratamientos de radiación incluyen las técnicas relacionadas de radioterapia de haz de protones conformal, radiocirugía estereotáctica, radioterapia estereotáctica, radioterapia intraoperatoria, modificadores químicos y sensibilizadores de radio. Ejemplos de fármacos de quimioterapia incluyen aminopterina, cisplatino, metotrexato, doxorubicina, daunorubicina y otros solos y en combinaciones. Ejemplos de tratamientos contra el cáncer también incluyen terapia de modificador de respuesta biológica (BRM), terapia biológica, bioterapia e inmunoterapia. Ejemplos de BRM incluyen interferones, interleuquinas y otras citoquinas y anticuerpos tales como rituximab y trastuzumab e incluso vacunas contra el cáncer tales como Sipuleucel-T. Otros ejemplos de terapias contra el cáncer incluyen terapias dirigidas como inhibidores de la señal de crecimiento tales como trastuzumab, gefitinib, imatinib, centuximab, dasatinib y nilotinib. Otro tipo de terapia dirigida incluye inhibidores de angiogénesis tales como bevacizumab que inhiben que los cánceres aumenten la vasculatura circundante y el suministro de sangre. Un último tipo de terapia dirigida incluye fármacos inductores de apoptosis que son capaces de inducir la muerte directa de células cancerosas.

Otra realización de la invención proporciona un método para controlar el cáncer en un sujeto. En una realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Luego se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. La cuantificación de Ig-CTF en la muestra se compara luego con un estándar conocido o con la cantidad de Ig-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior. A continuación, se puede determinar si el nivel de Ig-CTF del sujeto es indicativo de progresión, regresión o estabilización del cáncer.

Como ejemplos, el cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer metastásico, carcinoma hepatocelular o cáncer de páncreas.

En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFYRGLGEGGCTDDSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias se reconocen con los anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos in situ pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF está alterado en comparación con los niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para su desempeño.

A modo de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y se pone en contacto una muestra de ensayo biológico de un paciente con la molécula unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.

Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia western cuantitativa, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.

El CTF-inmunoglobulina puede ser detectado por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).

5 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.

10 En los métodos de la presente invención, la muestra biológica puede provenir de varias fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, líquido intersticial o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser
15 fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.

En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para su almacenamiento mientras se refrigeran o se congelan. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.

En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).

20 Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde los mamíferos son seres humanos. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.

25 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían utilizarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

30 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poliacrilamida, el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y
35 generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

40 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG.
45 Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

50 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, o anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína o rodamina pueden ser útiles en la invención. Los anticuerpos fluorescentes útiles se
55 pueden obtener comercialmente, por ejemplo, a través de Tago Immunologicals (Burlingame, CA). Los compuestos

5 fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

10 En otras realizaciones, el CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

En otra realización de las invenciones, el estándar conocido puede ser el nivel de Ig-CTF de sujetos que se identifican como libres de cáncer. En otra realización de la invención, el estándar conocido puede ser el nivel de Ig-CTF de sujetos que están identificados por tener cáncer. En otra realización de la invención, la muestra biológica mencionada en la etapa a. se obtiene del sujeto después del tratamiento para el cáncer o la muestra biológica se obtiene del sujeto en un momento anterior en el tiempo.

15 Uso de Ig-CTF en el diagnóstico, tratamiento y control de una enfermedad hepática

Una realización de la invención proporciona un método para diagnosticar una enfermedad hepática en un sujeto. En una realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Entonces se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. Finalmente, la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra se compara con un estándar conocido y se determina si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con enfermedad hepática.

Ejemplos de enfermedad hepática incluyen hepatitis autoinmune, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o hepatitis alcohólica.

En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFYRGLEGCTDDSSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias se reconocen con los anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF está alterado en comparación con los niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para su desempeño.

55 A título de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza 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 unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo

5 suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.

10 Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia Western de tipo cuantitativo, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.

15 El CTF-inmunoglobulina puede ser detectado por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).

20 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.

25 En los métodos de la presente invención, la muestra biológica puede provenir de una serie de fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, líquidos intersticiales o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.

30 En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.

35 En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).

40 Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde el mamífero es humano. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.

45 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían usarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

50 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poli(acrilamida), el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en reticulación, unión covalente o adsorción física de la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

- 5 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).
- 10 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.
- 15 20 25
- En otras realizaciones, CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.
- 30 Otra realización de la invención proporciona un método para tratar una enfermedad hepática en un sujeto. En una realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Entonces se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. Por último, se compara la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido y se determina si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con cáncer y se administra al sujeto, o se prescribe, un tratamiento para la enfermedad del hígado.
- 35 40
- Ejemplos de enfermedad hepática incluyen hepatitis autoinmune, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o hepatitis alcohólica.
- 45 En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados: SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFYRGLGEGGCTDDSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias se reconocen con los anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.
- 50 55

- 5 Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF está alterado en comparación con los niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para su desempeño.
- 10 A modo de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y se pone en contacto una muestra de ensayo biológico de un paciente con la molécula unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.
- 15 Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia western, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.
- 20 El CTF-inmunoglobulina puede ser detectado por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas con acoplador de rejilla o interferometría).
- 25 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.
- 30 En los métodos de la presente invención, la muestra biológica puede provenir de un cierto número de fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, fluidos intersticiales o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.
- 35 En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para almacenamiento mientras se refrigeran o se congelan. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.
- 40 En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).
- 45 Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde el mamífero es humano. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.
- 50 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían utilizarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se
- 55

une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

5 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poliacrilamida, el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetas, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

10 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

20 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador quimioluminiscente, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I , que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

En otras realizaciones, CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

40 Ejemplos de tratamientos de enfermedad hepática incluyen medicamentos, procedimientos ambulatorios, cirugía y trasplantes de hígado.

Otra realización de la invención proporciona un método para controlar la enfermedad hepática en un sujeto. En una realización, se expone una muestra biológica derivada de un sujeto a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno de ese primer anticuerpo y éste forma una mezcla. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Esta mezcla se expone a continuación a un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente a la Ig de la primera especie. Después de esta etapa, se puede realizar una etapa de lavado opcional. Entonces se cuantifica el Ig-CTF presente en la muestra. La cuantificación de Ig-CTF en la muestra se compara luego con un estándar conocido o con la cantidad de Ig-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior. A continuación, se puede determinar si el nivel de Ig-CTF del sujeto es indicativo de progresión, regresión o estabilización de la enfermedad hepática.

55 En ciertas realizaciones, el nivel de expresión, incluyendo la presencia o ausencia de al menos un Ig-CTF soluble se ensaya mediante un inmunoensayo. Los expertos 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 unirse a él y detectar dicha unión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "objetivo" se refiere al analito al que una sonda está diseñada para unirse. Por ejemplo, se proporcionan aquí los objetivos específicos de CTF de los anticuerpos depositados:

5 SEQ ID NO: 49, HVLVVAAAFVHFCYS (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 50, HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDSL (no forma parte de la invención), SEQ ID NO: 51, GGCTDDTLL (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 52, GGCSEEDAL (no forma parte de la invención). En ciertas realizaciones preferidas, la molécula inmunointeractiva será un anticuerpo. Por ejemplo, estas secuencias se reconocen con los anticuerpos depositados: clon 444-1D12 y clon 515-4D65. Las condiciones para incubar un anticuerpo con una muestra de ensayo varían, dependiendo del formato empleado en el ensayo, de los métodos de detección empleados y del tipo y naturaleza de la molécula de anticuerpo utilizada en el ensayo. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de los formatos de ensayo inmunológico comúnmente disponibles, por ejemplo, in10 munoensayo enzimático, radioinmunoensayo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoturbidimétricos, inmunonefométricos, separación magnética de inmunopartículas, inmunocromatografía, inmunomicrofluidos, inmunocentrífugos, Ouchterlony basados en difusión, inmunoelectroforesis en gel cohete o inmunoensayos *in situ* pueden adaptarse fácilmente al presente propósito.

15 Los inmunoensayos son útiles en la cuantificación de al menos un Ig-CTF del receptor de adiponectina en una muestra de ensayo, en particular para determinar si el nivel de al menos un Ig-CTF está alterado en comparación con los niveles normales detectables en individuos no enfermos. Como consecuencia, este inmunoensayo es de uso particular para determinar si un paciente puede tener una enfermedad o predisposición a la enfermedad. El inmunoensayo puede tener también otros usos, tales como, por ejemplo, el uso en el control de la progresión de la enfermedad o el control de la respuesta a las intervenciones terapéuticas. La invención descrita aquí se extiende a todos los usos de moléculas inmunointeractivas y ensayos de diagnóstico que requieren dichos inmunoensayos para su desempeño.

25 A título de ejemplo solamente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo surgido contra el fragmento se inmoviliza 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 unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo secundario-anticuerpo, se añade y se incuba un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, dejando suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material que no ha reaccionado se elimina por lavado y la presencia del complejo terciario se determina observando una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados por comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y luego se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.

35 Otros ejemplos de detección de Ig-CTF incluyen transferencia de Western de tipo cuantitativo, inmunohistoquímica, biochips de proteínas, espectrometría de masas y otros.

40 El CTF-inmunoglobulina puede ser detectado por cualquier método adecuado. Los paradigmas de detección que pueden emplearse 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 superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas de acoplador de rejilla o interferometría).

45 El propio Ig-CTF puede comprender un fragmento del extremo terminal C de adiporreceptor unido covalentemente a una inmunoglobulina. El término "adiporreceptor" incluye adiporreceptor 1 ("AdipoR1") y adiporreceptor 2 ("AdipoR2"). Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR1 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de AdipoR2 incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44. En los métodos de la presente invención, se puede detectar uno o más del (es decir, al menos un) Ig-CTF. Por ejemplo, puede detectarse cualquiera o una combinación de Ig-CTF en la que el CTF es uno de los fragmentos representados por las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 44.

55 En los métodos de la presente invención, la muestra biológica puede provenir de un cierto número de fuentes. Por ejemplo, la muestra biológica puede derivarse de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, líquido intersticial o preparaciones histológicas. Debido a su facilidad de acceso y manipulación, la sangre y el plasma pueden ser fuentes particularmente útiles de la muestra biológica.

En algunos casos, un conservante puede ayudar a estabilizar las muestras biológicas para el almacenamiento mientras se refrigera o se congela. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen fluoruro, heparina o EDTA.

En otras realizaciones, el tejido es de hígado, páncreas, ganglio linfático, adiposo, músculo o cerebro. Un ejemplo de un método para detectar Ig-CTF en estos tejidos es la inmunohistoquímica (tinción de tejido).

5 Las muestras biológicas pueden derivarse de cualquier mamífero. Una realización preferida sería donde los mamíferos son seres humanos. Sin embargo, otros mamíferos, incluyendo de zoológico, de investigación y los animales domésticos (mascotas) tales como ratón, rata, conejillo de Indias, hámster, perro, gato, oveja, vaca, caballo, burro, mula o cerdo también serían fuentes potenciales de muestras biológicas.

10 En otras realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos que podrían usarse como el primer anticuerpo para el método. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (clon 444-1D12) o un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (clon-515-4D6). Los antígenos y la metodología utilizada para preparar estos anticuerpos se explican completamente en el Ejemplo 12.

15 En algunos casos, el primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido. El soporte sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente utilizados la celulosa, la poliacrilamida, el nailon, la nitrocelulosa, el poliestireno, el cloruro de polivinilo o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, casetes, tubos, perlas, discos, placas o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en entrecruzamiento uniendo covalentemente o adsorbiendo físicamente la molécula al portador insoluble. En una realización, el soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

20 En el Ig-CTF, la Ig puede ser los isotipos de inmunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. Un ejemplo preferido de una Ig en Ig-CTF, es IgG. Las inmunoglobulinas están hechas de varias subunidades. Por ejemplo, la IgG está formada por cadenas pesadas gamma (γ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgA está formada por cadenas pesadas alfa (α) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgM está formada por cadenas pesadas mu (μ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgD está formada por cadenas pesadas delta (δ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La IgE está formada por cadenas pesadas épsilon (ϵ) y cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ). La Ig de Ig-CTF puede ser también una subunidad de uno de los isotipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, la Ig puede ser una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o la Ig puede ser una cadena pesada gamma de IgG. Alternativamente, la Ig puede ser una región de unión al antígeno (Fab).

30 En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable. Ejemplos de marcadores detectables incluyen un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador de epítipo, biotina, un marcador cromóforo, un marcador de electroquimioluminiscencia (ECL) o una enzima. Los marcadores radioactivos incluyen ¹²⁵I, que se puede unir a un anticuerpo (Harlow y Lane, citado más arriba, 1988). Las marcas fluorescentes útiles incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, metales de lantánidos, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Los agentes de unión 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, 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). Los compuestos fluorescentes, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con una luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Una enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa se puede unir, por ejemplo, a un fragmento del extremo terminal C del receptor antiadiponectina o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, 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.

En otras realizaciones, CTF libre no se detecta debido al diseño de los ensayos.

50 En otra realización de las invenciones, el estándar conocido puede ser el nivel de Ig-CTF de sujetos que se identifican como normales. En otra realización de la invención, el estándar conocido puede ser el nivel de Ig-CTF de sujetos que se identifican por tener enfermedad hepática. En otra realización de la invención, la muestra biológica mencionada en la etapa a. se obtiene del sujeto después del tratamiento para enfermedad hepática o la muestra biológica se obtiene del sujeto en un momento anterior en el tiempo después del tratamiento para enfermedad hepática.

55 La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos, en los que todas las partes y porcentajes están en peso, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de CTF-inmunoglobulina en sangre, tejido y células

Los análisis de transferencia Western se realizaron en plasma humano, páncreas, tejido adiposo, hepático y muscular, así como miocitos y homogeneizados de cultivos celulares epiteliales de acuerdo con los siguientes métodos y variaciones de los mismos.

Las muestras y homogeneizados con concentración de proteína de aproximadamente 20 µg/mL se hirvieron en agua durante 5 minutos en regulador con SDS y se enfriaron en hielo para desnaturalizar la proteína. La muestra se centrifugó a continuación para eliminar el precipitado y se sometió a ebullición la muestra 1:1 con regulador de Laemmli de BioRad con beta-mercaptoetanol al 5% para romper los enlaces disulfuro. Las muestras tratadas se cargaron en el Gel Listo (BioRad) al 12% o 10% y el gel SDS-PAGE se las hizo correr en Tris, glicina, regulador SDS (BioRad) a 110 V (BioRad PROTEAN Tetra Cel) durante 1-1,5 horas hasta que el azul de bromofenol alcanzó el fondo del gel. Las placas de gel se desensamblaron, se remojaron en regulador de transferencia y los geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa de 0,2 µm a 30 V en una cámara de 4°C durante la noche.

Después de la transferencia de la proteína, la nitrocelulosa se enjuagó y se lavó con regulador TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4, Tween-20 al 0,1%). La membrana se bloqueó entonces con BSA al 5% en TTBS a temperatura ambiente con agitación suave. Después se retiró el regulador de bloqueo y se incubó la membrana con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. Para CTF de AdipoR1, se utilizó el mAb 444-1D12 conjugado con fosfatasa alcalina (2,5 mg/mL diluido 1:1.000, Siemens Healthcare Diagnostics). La membrana con conjugado de anticuerpo se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas o a 4°C durante la noche con agitación suave. El anticuerpo se descartó entonces y el gel se lavó tres veces con TTBS durante 5 minutos cada vez. La membrana se incubó con el sustrato de fosfato alcalino o peroxidasa de rábano y se desarrolló y registró el color. En algunos casos, la membrana se fotografió mediante exposición a una película de rayos X (Fisher) en un tiempo deseado (3 segundos a 10 minutos) y después se desarrolló usando un revelador/fijador Kodak GBX.

Los resultados de las transferencias de Western obtenidas en plasma humano con anticuerpos monoclonales para CTF se muestran en la Figura 3. Los resultados son típicos para todos los anticuerpos monoclonales para R1 y R2 de CTF. La Figura 3a muestra los resultados para el plasma de tres pacientes no diabéticos (N), tres pacientes resistentes a la insulina (IR) y tres pacientes diabéticos (D). Todos muestran que CTF estaba presente en inmunoglobulina a 160 kDa, cadena pesada de inmunoglobulina a 55 kDa y cadena ligera de inmunoglobulina a 26 kDa y fragmentos de los mismos. Las muestras se trataron con mercaptoetanol, y el mercaptoetanol rompe los enlaces disulfuro, por lo tanto, el CTF no se unió a la inmunoglobulina por enlaces disulfuro. La Figura 3b muestra las mismas muestras de pacientes después del tratamiento con condiciones alcalinas (regulador Tris 250 mM, pH 11,5 y 37°C durante 2 horas). Los tratamientos rompen el enlace de CTF a la inmunoglobulina humana y se detecta CTF. En la Figura 3c, se midió el gel para muestras alcalinas tratadas con anti-IgG-ALP humana, y los resultados demostraron que la inmunoglobulina humana estaba todavía presente después de la liberación de CTF. Estas condiciones alcalinas y otras que se ha demostrado que rompen el enlace éster entre C3b y cadenas de inmunoglobulina, liberaron también CTF de inmunoglobulina (Lutz HU y Stammler P. Preferential formation of C3b-IgG Complexes in vitro and in vivo from nascent C3b and naturally occurring anti-band 3 antibodies J Bio Chem 268, 17418-426, 1993).

Los resultados de las transferencias de Western obtenidas en hígado, páncreas, músculo y tejidos mesentéricos de ratas normales, ratas diabéticas y ratas diabéticas tratadas con AdipoR1 CTF25 (SEQ ID NO: 11) se muestran en la Tabla 3. Los resultados son típicos para todos anticuerpos monoclonales para AdipoR1 y AdipoR2 de CTF y tratamientos ensayados. Todos los tejidos muestran la presencia de CTF-inmunoglobulinas. Las muestras de hígado mostraron una cadena ligera de inmunoglobulina a 26 kDa y algunas IgG completas y fragmentos a 100 y 160 kDa, pero sin cadena pesada de inmunoglobulina a 50 kDa. Las muestras de páncreas mostraron cadena pesada y alguna cadena ligera, pero sin IgG completa. Las muestras de músculo y grasa mostraron cadena pesada y cadenas ligeras, pero sin IgG completa. El tratamiento con CTF no aumentó las bandas ya que el CTF libre no se une a la inmunoglobulina sin activación de los péptidos para formar enlaces covalentes. Se observaron diferencias en la cantidad de cadenas de inmunoglobulina con CTF entre ratas individuales y entre ratas normales y diabéticas. Todos los tejidos contenían IDE y TACE.

Tabla 3. CTF-inmunoglobulina en tejidos

Tipo de tejido	Las cadenas de inmunoglobulina observadas principalmente con CTF		
	Ratas normales	Ratas diabéticas	Ratas diabéticas tratadas

hígado	Cadenas ligeras	Cadenas ligeras	Cadenas ligeras
páncreas	Cadena pesada	Cadena pesada	Cadena pesada
músculo	Cadenas pesada y ligera	Cadenas pesada y ligera	Cadenas pesada y ligera
tejidos mesentéricos	Cadenas pesada y ligera	Cadenas pesada y ligera	Cadenas pesada y ligera

5 Además, se realizaron estudios de órganos objetivo. Se recogieron de dos grupos de conejos (productores y no productores de CTF antipoliclonal) el hígado, músculo, tejido adiposo, cerebro y páncreas para portaobjetos de rebanadas criogénicas. Los tejidos se tiñeron para CTF libre (mAb 461-4H11), CTF-IgG (mAb 444-1D12), enzima de conversión del factor de necrosis tumoral- α (TACE akaADAM-17), enzima degradante de insulina (IDE) e IgG. La unión se llevó a cabo con un péptido bloqueador del receptor de Fc y usando anticuerpos marcados en forma fluorescente con un microscopio de barrido. Los resultados mostraron que el hígado es el principal órgano objetivo para la absorción de CTF. El hígado, el cerebro y el páncreas enfermos presentan una mayor absorción. El hígado, el cerebro y el páncreas son donde reside IDE (actúa CTF en IDE). El músculo y alguna grasa marrón tenían TACE para liberar CTF. Una respuesta inmune al CTF aumenta en gran medida la absorción de CTF-IgG en el cerebro, el páncreas y el hígado. Los resultados se muestran en la Tabla 4. El cerebro y el páncreas fueron a veces débilmente positivos para CTF dentro de algunas áreas de tejido especialmente alrededor de las áreas endoteliales e intersticiales que muestran lesiones o infiltración de glóbulos blancos (WBC). El músculo sólo fue positivo en la membrana externa de la célula debido al receptor intacto. El tejido adiposo objetivo no mostró CTF, pero había algunas trazas de CTF acumulado en el tejido adiposo marrón.

Tabla 4.

	Hígado	Cerebelo	Parte derecha e izquierda del cerebro	Páncreas	Grasa (adiposo)	Músculo
CTF	Pos. 5+	Pos 1+	Pos 1+	Pos 1+	Neg.	Pos 1+
TACE (proteasa que forma CTF)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos	Pos
IDE (Proteasa inhibida por CTF)	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg.	Neg.
Tinción para recuento de IgG	Pos donde se encontró CTF	Pos donde se encontró CTF	Pos donde se encontró CTF	Neg	Neg	Neg

20 Los anticuerpos para CTF ilustraban una absorción mucho mayor de CTF-IgG y CTF en el cerebro, el páncreas y el hígado. Esto fue en conejos con anticuerpos anti-CTF. Los conejos habían sido inoculados con AdipoR1CTF 33 mer (SEQ ID NO: 1) unido a BSA y LBH. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 4.

Tabla 5.

Capacidad de los conejos para producir anticuerpos policlonales	CTF en hígado	CTF en cerebro	CTF en páncreas
Negativos N = 3	Pos 5+	Pos 1+	Pos 1+
No produjeron Anti CTF	Pos 6+	Neg.	Pos 1+
	Pos 5+	Neg.	Pos 1+
Positivos N = 3	Fuertemente Pos. Pos 35+	Pos	Pos

Productor anti-CTF	Pos 40+	Pos 10+	Pos 8+
	Pos 30+	Pos 11+	Pos 12+
		Pos 8+	Pos 8+

5 Además, se realizaron estudios de órganos objetivo. Se sacrificaron tres grupos de ratas y se recogieron el hígado, el músculo, el tejido adiposo, el cerebro, los ganglios linfáticos y el páncreas para portaobjetos de rebanadas criogénicas. Estos tres grupos representaron ratas sin diabetes, 2-4 semanas en diabetes temprana y diabetes tardía. Todos se caracterizaron por su estado diabético mediante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT) y la prueba de hbA1c. Los tejidos se tiñeron para CTF libre (mAb 461-4h11), IgG-CTF (mAb 444-1D12), TACE, IDE e IgG. La unión se llevó a cabo en presencia de un péptido bloqueador del receptor Fc y usando anticuerpos marcados de forma fluorescente con un microscopio de barrido. Los resultados mostraron que los ganglios linfáticos son otro objetivo primario para la absorción de CTF. A medida que avanzaba la diabetes, la cantidad de CTF observada en el hígado y los ganglios linfáticos aumentó. El cerebro y el páncreas también mostraron una mayor absorción. Estos resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6.

CTF	Ratas normales N = 3	Ratas diabéticas de corto plazo N = 3	Ratas diabéticas de largo plazo N = 3
Hígado	Neg.	Pos.	Pos.
	Pos. 2+	Pos. 5+	Pos. 6+
	Neg.	Pos. 4+	Pos. 7+
	Neg.	Pos. 3+	Pos. 5+
Ganglio linfático	Neg.	Pos.	Pos.
	Pos. 5+	Pos. 10+	Pos. 5+
	Neg.	Pos. 11+	Pos. 11+
	Neg.	Pos. 8+	Pos. 5+

15 Se mantuvieron en cultivo monocitos de ratón de cultivo celular (C2C12) y células epiteliales de mono verde (VERO) (American Type Cell Culture, ATCC, Manassas, VA) usando medio RPMI-1640, mientras que las células normales se mantuvieron con medio de Eagle modificado (MEM). Ambos medios contenían glutamina 2 mM, penicilina (50 unidades/mL), estreptomina (50 µg/mL) y suero bovino fetal al 10%. El medio estaba libre de citoquinas. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ y se propagaron por división con 1 a 4 diluciones utilizando PBS/EDTA para confluencia de crecimiento celular. Las líneas celulares se sincronizaron y se indujeron con R1 CTF25 SEQ ID NO: 11 o adiponectina globular. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. CTF-inmunoglobulina en células

Tipo de célula	Cadenas de inmunoglobulina observadas principalmente con CTF		
	No tratadas	Tratadas con CTF	Tratadas con adiponectina
Miocytes	Cadenas pesadas e IgG completa	Cadenas pesadas e IgG completa	Cadenas pesadas e IgG completa
Células Epiteliales	Cadenas pesadas e IgG completa	Cadenas pesadas e IgG completa	Cadenas pesadas e IgG completa

5 Ambas líneas celulares expresaron el receptor 1 de adiponectina y los lisados de ambas líneas celulares contenían CFT-inmunoglobulina, que comprendía la cadena pesada y la IgG completa, pero sin la forma de la cadena ligera en las transferencias de Western desnaturalizadas. Como estos son cultivos celulares cultivados en suero bovino fetal que contiene IgG bovina, las células unen CTF a IgG. Por lo tanto, cualquier de las células que expresan receptores de adiponectina actúan como células presentadoras de antígeno y causan la activación de CTF para su unión a inmunoglobulina (Figura 2). Véase Golz para una lista de células y tejidos que expresan al receptor 1 y 2 de adiponectina.

10 El tratamiento de cultivos celulares con CTF R1 CTF25 SEQ ID NO: 11 no aumentó el CTF-inmunoglobulina ya que esta forma de CTF no se une a inmunoglobulina sin activación. Además, el tratamiento con adiponectina no aumentó las bandas de CTF-inmunoglobulina presumiblemente, ya que el suero ya contenía adiponectina para unirse al receptor.

15 Las fracciones de sangre también se estudiaron para ver si CTF-IgG está en sangre y si las células inmunitarias portan CTF. Las células se aislaron por filtración y se tiñeron con anticuerpos para CTF-IgG libre (mAb 444-1D12) e IgG con un marcador fluorescente. Las células fueron luego contrastadas con DAPI y anticuerpos anti-glóbulos blancos (CD45, CD3 y CD19) con un segundo marcador fluorescente. La unión se llevó a cabo en presencia de un péptido bloqueador del receptor de Fc. Los resultados se determinaron en un microscopio de barrido. Los resultados mostraron que la unión de IgG CTF se lleva a cabo en glóbulos blancos (B polimorfonucleares y células T). Estas células B y T polimorfonucleares parecen ser neutrófilos y basófilos. Los glóbulos rojos no portan CTF. CTF y CTF IgG se detectan por inmunohistoquímica (IHC) por separado del receptor completo. Estos resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8.

	RBC	WBC (CD45+) Polimorfo nuclear	Células T CD3	Células B CD19
CTF Presente en células	Neg	Pos en muchas células incluso con bloqueo de IgG	Células Pos observadas en 10 mL de sangre	Células Pos observadas en 10 mL de sangre
Unión de IgG	Pos	Pos	Pos	Pos
Fuente	Sangre humana entera	Sangre humana entera	Sangre humana entera	Sangre humana entera

Se confirmó que no se detectó la expresión del receptor, sólo IgG-CTF y CTF.

25 **Ejemplo 2: Condiciones alcalinas liberan CTF de Ig; correlación con la resistencia a la insulina**

Las muestras de plasma se trataron con solución alcalina para liberar CTF de la inmunoglobulina para permitir la medición de CTF total en plasma. Se recogieron muestras de plasma de pacientes con pruebas de tolerancia a la glucosa y diagnóstico de diabetes (véase la Tabla 9). Las muestras se ensayaron mediante inmunoensayo con base en dos anticuerpos para CTF y se determinó una correlación de CTF liberado con la resistencia a la insulina.

30 Tabla 9. Cohorte de pacientes resistentes a la insulina

Recolección	Controles	Resistencia a la insulina	Diabéticos
Correlación de la prueba de tolerancia a la glucosa de la muestra de plasma	N = 50 Prueba oral negativa de tolerancia a la glucosa (OGTT) y no diabéticos con hbA1C < 6,5%	N = 50 OGTT positiva y no diabéticos con hbA1C < 6,5%	N = 50 OGTT positiva y diabéticos con hbA1C > = 6,5%.

- 5 La placa de ELISA de una muestra típica se preparó recubriendo primero una placa con un anticuerpo anti-CTF tal como mAb 444-1D12 a una concentración de 12 µg/mL en solución salina regulada con Tris (TBS). Después, la placa se lavó con TBS usando una lavadora de placas automatizada (5 veces con 300 µL). La placa se bloqueó entonces con albúmina de suero bovino al 1% en TBS. La placa se lavó de nuevo con TBS. Los calibradores de CTF se prepararon en TBS a pH 6,5 con 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 y 0 ng/mL usando CTFR125, la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO: 11) HFYGVSNLQEFRYGLEGGCTDDTLL. Las muestras de pacientes tratados se prepararon mezclando 50 µL de muestra con 40 µL con Tris 50 mM a pH 10,5 durante 1 h a 37°C seguido de neutralización del pH con 120 µL de Tris 0,5 M a pH 5,2. Los calibradores y las muestras se cargaron con 100 µL. La placa se selló y se incubó con una velocidad de agitación de 1.000 rpm a 35°C durante 60 min por pozos.
- 10 La placa de ELISA de un ensayo típico se midió después de lavar de nuevo con TTBS para eliminar el CTF no unido. Se aplicó un segundo anticuerpo anti-CTF conjugado con fosfatasa alcalina (ALP) tal como mAb 444-1D12 (Siemens Healthcare Diagnostic) a una concentración de 4,0 µg/mL en TTBS a razón de 100 µL a cada pozo. La placa se selló y se incubó en un agitador a una velocidad de 1.000 rpm a 35°C durante 60 minutos seguido
- 15 nuevamente de lavado con TTBS. La cantidad de ALP en cada pozo se midió utilizando un sustrato PNPP 1-Step^{MR} (Fisher Thermo Scientific) en un lector de placas y se incubó a 37°C leyendo la placa a la hora usando absorbancia a 405 nm durante 12 h.

Tabla 10. Correlación de la resistencia a la insulina para CTF libre

R1 Total	Promedio	DE	Min	Máx.
Normales	671,3	1211,3	5,0	6951,3
Diabéticos	1030,2	1662,0	19,6	7758,9
Resistentes a la insulina	1241,5	2079,3	38,0	11137,0

- 20 El resultado de la correlación obtenida se muestra en la Tabla 10. Todos los pacientes fueron medibles con fondo bajo y dentro de un intervalo de placas de <10% CV y un intervalo de ensayo de 100 a 10.000 pg/mL. Los valores totales unidos aumentaron 1,8 veces en pacientes con resistencia a la insulina.

- 25 Se confirmó la inestabilidad del CTF libre (SEQ ID NO: 1 a 44) por encima de pH 7,0. Como resultado, el tratamiento del pH tuvo que ser cuidadosamente controlado para obtener mediciones reproducibles de CTF libre. Incluso con tales controles, la variación entre los valores de placas fue a menudo ~ 20% y mayor que la deseada para aplicaciones clínicas. El CTF libre es más estable por debajo de pH 7, preferiblemente pH 6,5, ya que típicamente reside en el medio ácido dentro de la célula. Aquí, como se ha descrito anteriormente, los CTF libres forman dímeros. Ya que la CTF-inmunoglobulina es estable en pH menor a 8 y es la forma principal de CTF encontrada fuera de la célula, la medición de la CTF-inmunoglobulina era la deseada para la aplicación clínica.

Ejemplo 3: Identificación de cadenas de inmunoglobulina que contienen CTF

- 30 Las proteínas de suero humano de tipo comercial se sometieron a transferencia Western con mAb444-1D12 ALP de acuerdo con el método del Ejemplo 1. Los grados comerciales ensayados incluyeron IgG (14506 Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis Mo), cadena ligera kappa (AG744 Millipore Billerica, MA antiguamente Chemicon), lambda (P164-1 ScipacLtd, Kent RU), fragmento Fc (AG744 Chemicon), IgA (1-0633 Sigma) e IgM (1-8260, Sigma). La inmunoglobulina IgG está compuesta de cadenas ligeras kappa y lambda de aproximadamente 26 kDa y dos
- 35 cadenas pesadas gamma. IgA, IgM, IgD e IgE no contienen cadena pesada gamma y en vez de eso se basan en cadenas pesadas alfa, mu, delta y épsilon, respectivamente. Todas las inmunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, contienen la cadena ligera kappa. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Cadenas de inmunoglobulina que contienen CTF

Proteínas de suero humano grado comercial	Banda observada con transferencia Western para anticuerpo monoclonal CTF R1	
	Bandas de cadena gamma	Bandas de cadena kappa
IgG	50 kDa	26 kDa

IgM	Sin bandas	26 kDa
IgA	Sin bandas	26 kDa
kappa	Sin bandas	26, 15, 13 y 12 kDa
Lambda	Sin bandas	Sin bandas
Fc	Sin bandas	Sin bandas

5 Los datos mostraron que el CTF está unido a cadenas gamma y kappa de IgG. No se observó CTF libre como monómero o dímero en IgG. Los datos también mostraron que el CTF está unido a las cadenas kappa de IgA e IgM. Se observaron fragmentos de cadena kappa menores de 25 kDa. IgD e IgE también contienen cadenas kappa y por lo tanto también se espera que contengan CTF unido. La región Fc de la cadena pesada gamma, también conocida como dominio de la función efectora, no contenía CTF unido a los fragmentos de cadena pesada de 50 o 25 kDa. Esto indica que CTF está unido a cadenas gamma y kappa en la región Fab de IgG.

10 A medida que el CTF se integra en los isotipos IgG, IgA, IgM, IgD e IgE en la cadena kappa, utilizando un ensayo en sándwich monoclonal anti-kappa y anti-CTF, mide el CTF unido en todas las inmunoglobulinas. Por el contrario, un ensayo que emplea un ensayo sándwich monoclonal anti-gamma y anti-CTF mide el CTF unido sólo en el isotipo IgG. De forma similar, otros anticuerpos específicos para IgG, IgA, IgM, IgD o IgE permiten ensayos en sándwich monoclonales que miden el CTF unido en esa forma.

Ejemplo 4: Correlación de CTF-inmunoglobulina

15 Las muestras de plasma se midieron para CTF-inmunoglobulina usando un método ELISA con anticuerpo monoclonal para CTF R1 y CTF R2 y un anticuerpo para inmunoglobulina usando un anticuerpo monoclonal para cadena de inmunoglobulina kappa o gamma conjugada a ALP. La metodología de ELISA utilizada fue la misma que la descrita anteriormente sin el tratamiento alcalino de las muestras y asignando muestras de pacientes con CTF-inmunoglobulina como patrones y usando tiempos de lectura más cortos para el ensayo.

20 Se usó el ensayo de CTF-inmunoglobulina unido para probar la cohorte de pacientes resistentes a la insulina (véase la Tabla 12). Todos los pacientes fueron medibles con fondo bajo, y dentro del intervalo de placa de < 10% CV y un intervalo de ensayo de 100 a 10.000 pg/mL. Todavía se detectó CTF libre extremadamente elevado, pero más en las muestras normales. Adicionalmente, el CV entre placas se redujo a < 10% y la desviación estándar dentro del grupo de pacientes se redujo.

Tabla 12. Correlación resistente a la insulina para CTF-inmunoglobulina

CTF R1 gamma	Promedio	DE	Min	Máx.
Normales	1114,3	1431,6	218,2	7476,1
Diabéticos	814,0	594,1	202,2	2630,9
Resistentes a insulina	558,5	384,7	147,2	2263,1
CTF R1 kappa	Promedio	DE	Min	Máx.
Normales	1011,0	1303,7	78,9	6422,3
Diabéticos	897,4	718,0	289,2	4465,4
Resistentes a insulina	645,3	302,2	269,6	1480,4
CTF R2 gamma	Promedio	DE	Min	Máx.
Normales	2118,2	1581,2	415,7	9394,9

Diabéticos	1674,9	829,1	222,9	4099,6
Resistentes a insulina	1412,5	704,0	441,6	4218,2
CTF R2 kappa	Promedio	DE	Min	Máx.
Normales	1205,1	772,7	320,4	4598,6
Diabéticos	1043,1	428,6	246,6	2026,0
Resistentes a insulina	981,4	458,1	202,8	2292,8

5 Los resultados de la correlación se muestran en la Tabla 12. Se observó una disminución de 2,0 veces en el CTF-inmunoglobulina en plasma en pacientes con resistencia a la insulina. El CTF-inmunoglobulina se acumula en tejidos y células que causan resistencia a la insulina. Las mediciones fueron similares cuando se midió la CTF R1 inmunoglobulina frente a la CTF R2 inmunoglobulina. Las mediciones fueron similares cuando se midió la inmunoglobulina de cadena kappa frente a la inmunoglobulina de cadena gamma. De la combinación, CTF R1 inmunoglobulina de la cadena gamma presentó la mayor disminución de la resistencia a la insulina. Aquí, utilizando un umbral de < 300 pg/mL de CTF-inmunoglobulina como indicación de resistencia a la insulina, la sensibilidad diagnóstica fue del 70% y la especificidad del 70%.

10 Estos resultados se confirmaron usando los protocolos del Ejemplo 13. Se diseñó un estudio para comparar no diabéticos con diabéticos tempranos y diabéticos tardíos. El ensayo de IgG-CTF se utilizó con muestras de sangre entera obtenidas de pacientes sometidos a tamizaje de glucosa en ayunas. Los pacientes se definieron como normales si tenían tanto glucosa en ayunas normal de < 100 mg/dL como una HbA1c en sangre entera normal de < 6,5%. Los pacientes con glucosa anormal en ayunas en sangre entera (> 135 mg/dL) fueron sometidos a una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). Los pacientes con un resultado de OGTT anormal (valores de glucosa en plasma > 126 mg/dL a las 0 horas o > 200 mg/dL a las 2 horas) o un HbA1c anormal en sangre total < 6,5% se clasificaron como prediabéticos o de tolerancia alterada a la glucosa.

15 A través de este proceso, 101 pacientes fueron clasificados como no diabéticos y 127 pacientes clasificados como diabéticos. Se realizaron ensayos de IgG-CTF por ELISA en todos los pacientes diabéticos y no diabéticos. Los resultados de IgG-CTF se resumen en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13

	IgG-CTF normal	IgG-CTF anormal
No resistentes a la insulina	85 sujetos	16 sujetos
Resistentes a la insulina	22 sujetos	105 sujetos

25 Se definieron los positivos como tolerancia alterada a la glucosa con un valor a los 120 min de más de 140 mg/dL o diabéticos a largo plazo. El umbral utilizado fue de 5,5 ng/mL de IgG-CTF. La sensibilidad fue del 83,2%. La especificidad fue de 84%, el valor predictivo positivo (PPV) fue de 87% y el valor predictivo negativo (NPV) fue del 80%. PPV se calculó como verdaderos positivos (TP)/(TP + falsos positivos (FP)). NPV se calculó como verdaderos negativos (TN)/(TN + falsos negativos (FN)).

Tabla 14

	IgG-CTF normal	IgG-CTF anormal
No resistentes a la insulina	90 sujetos	19 sujetos
Resistentes a la insulina	17 sujetos	102 sujetos

El umbral utilizado fue de 5,5 ng/mL de IgG-CTF y el PPV fue del 84% y el NPV del 84%.

Las conclusiones sacadas de estos experimentos son que se logró una buena correlación. A 0 y 120 minutos produjeron los mismos valores de IgG-CTF, por lo que es un marcador crónico que sólo requiere una medición de tiempo 0.

- 5 Además, se realizó la prueba para CTF-inmunoglobulina en una cohorte de muestras de suero de pacientes con crecimiento celular anormal (véase la Tabla 15). Los pacientes con carcinomas metastásicos y localizados se separaron de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) que se caracteriza por la resistencia a la insulina y la hepatitis alcohólica y la hepatitis autoinmune que se caracterizan por la presencia de células inflamatorias en el hígado.

Tabla 15. Cohorte de pacientes con cáncer y enfermedad hepática

Colección	Normales N=30	Cáncer de mama N = 9	Cáncer de páncreas N = 5	Enfermedad de hígado N = 23
Población de crecimiento celular anormal (Suero)	Sin historia de cáncer, enfermedad hepática, diabetes o síndrome metabólico	Compuesto de N = 8 carcinomas localizado y N = 1 cáncer metastático	Compuesto de N = 4 carcinomas localizados y N = 1 cáncer metastático	Compuesto de N = 12 esteatohepatitis no alcohólica (NASH); N = 3 hepatitis alcohólica; N = 6 hepatitis autoinmune; N = 2 carcinoma hepatocelular.

10

Los resultados de la correlación se muestran en la Tabla 16. Se observó un aumento de 2,5 veces en el CTF-inmunoglobulina en pacientes con cáncer de mama y de hígado. Se observó un aumento de 1,7 veces en los pacientes con cáncer metastático. Los pacientes con cáncer de páncreas presentaron disminuciones en CTF-inmunoglobulina. Los pacientes con enfermedades hepáticas proliferativas tales como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), la hepatitis alcohólica y la hepatitis autoinmune presentaron incrementos aún más significativos en CTF-inmunoglobulina, hasta un aumento de 5,5 veces. Aunque no está ligado a un mecanismo de acción particular, se cree que el páncreas productor de insulina está protegido de ser CTF-inmunoglobulina mientras que el hígado que degrada la insulina es más susceptible a CTF-inmunoglobulina.

15

Tabla 16. Cohorte de pacientes con cáncer y enfermedad hepática

	AdipoR1 kappa pg/mL	DE	Cambio en CTF
Normal	594,9	724,9	1
Cáncer de mama	1486,1	1692,9	2,5
Cáncer metastásico	1028,8	11,8	1,7
Cáncer de páncreas	327,5	194,9	0,6
Carcinoma hepatocelular	1512,3	483,6	2,5
Hepatitis autoinmune	2028,7	1145,6	3,4
Esteatohepatitis no alcohólica (NASH)	2457,3	1570,4	4,1
Hepatitis alcohólica	3279,2	2569,0	5,5

20

Ejemplo 5: Aislamiento de CTF-inmunoglobulina nativa

Se aisló CTF-inmunoglobulina nativa mediante el método de transferencia Western. Alternativamente, se aisló CTF-inmunoglobulina nativa capturándolo sobre perlas de resina polimérica conjugadas con el anticuerpo monoclonal mAb 444-1D12. Se utilizó el kit de acoplamiento de proteína PolyLink (Bangs Laboratories Inc.) para esta

5 conjugación. Otras perlas de captura y partículas utilizadas comúnmente también funcionaron. Se liberó CTF-inmunoglobulina nativa de la perla de captura mediante ajuste del pH. También podría purificarse mediante fraccionamiento en IgG mediante purificación en columna de proteína A. La pureza e identificación podrían establecerse mediante transferencia Western para anticuerpos anti-cadena humana kappa, anti-cadena gamma humana y anti-CTF. También se utilizó espectrometría de masas para la identificación de picos. Las formas principales de inmunoglobulina identificadas incluyen IgM, IgG, Fab2, Ig, cadena gamma y cadena ligera. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17

Identificación de la banda	kDa observado en trasferencias Western					
	Plasma	Tejido graso	Tejido hepático	Tejido muscular	Tejido pancreático	Cultivo de células de miocitos
IgM	250			200		200
IgG	160					
Fab2	100		100	110		100-110
desconocida			70	80		60
pesada gamma	55			55	50	
AdipoR1		37-45	43	37-45		47
CTF de cadena ligera	25	25	25	25	25	
Cadena ligera	22	22	22	22	22	
Dímero de CTF	8					

10 La Tabla 17 muestra que la masa para el receptor AdipoR1 es 43 kDa para la forma de longitud completa. El receptor completo ha aparecido en muestras de tejido que contienen membranas y no plasma. Los tejidos generalmente no contenían dímero detectable, pero esto podría estar por debajo del límite de detección de los Western.

15 El análisis por ELISA que compara IgG-CTF con IgG mostró que el porcentaje de IgG CTF en plasma del paciente era < 0,2% de todo el IgG en plasma en la mayoría de los pacientes. Este porcentaje fue similar para IgG CTF R1 y R2. El porcentaje de IgM CTF fue típicamente más bajo, pero en el plasma del paciente se encontró que era aproximadamente < 0,03% de todo el IgM en plasma en la mayoría de los pacientes. Este porcentaje fue similar para la unión de R1 y R2. La proporción de CTF con respecto a IgG era típicamente de 1 a 2 en la mayoría de los pacientes con un intervalo de 1 a 5.

20 Se ensayaron estudios de ELISA con reactividad cruzada de anticuerpos IgM, IgG, gamma, kappa y Fab en plasma para fragmentos unidos a CTF y confirmaron que estaban presentes IgM, IgG, gamma, kappa y Fab. Adicionalmente, se confirmó que dos CTF están típicamente en una IgG.

Ejemplo 6: Aislamiento de antígenos para CTF inmunoglobulina nativo

25 Las células que se unen a CTF-inmunoglobulina nativa puede aislarse a partir de materiales biológicos, tales como tejidos, fluidos y cultivos de células usando los ensayos de CTF-IgG (IHC o ELISA) descritos en la presente memoria. Los métodos de aislamiento de las células utilizan a menudo anticuerpos unidos a partículas magnéticas, partículas fluorescentes, perlas de captura y otros materiales útiles para aislar y clasificar células tales como en

citología de flujo, formación de imágenes microscópicas, filtración y otros. El CTF-inmunoglobulina nativa puede servir como anticuerpos en la fase de captura o para la clasificación por detección de células.

5 El CTF-inmunoglobulina nativa se unió al isotiocianato de fluoresceína (FITC) como un compuesto generador de señales. Las células cancerosas se aislaron mediante un método de filtración, para aislar células tumorales
 10 circulantes de otras células de la sangre. La sangre del paciente se lisó mediante cloruro de amonio para eliminar los glóbulos rojos, pero no los glóbulos blancos o las células cancerosas. Se capturaron los glóbulos blancos o las células cancerosas en una membrana de poro de 8 µm que permite que pasen los glóbulos rojos. Se forman imágenes de las membranas con un microscopio de fluorescencia de barrido para encontrar las células cancerosas y los glóbulos blancos uniéndose al CTF-inmunoglobulina nativa. Se contrastaron los glóbulos blancos con anticuerpos CD3, CD45 y CD19 con colorante Cy5 para confirmar la identidad de las células de unión a CTF-inmunoglobulina como neutrófilos, células beta y células T. Las células cancerosas se contrastaron con anticuerpos EpCAM con colorante rojo Texas para confirmar la identidad de las células de unión a CTF-inmunoglobulina como células de carcinoma.

15 Las células individuales que se unen a CTF-inmunoglobulina nativa y se eliminan de la membrana y pueden amplificarse mediante cultivo celular. Este aislamiento y amplificación de células puede ser útil para la respuesta celular para identificar formas bioquímicas de impedir que CTF se conecte a IgG, bloquear que CTF-IgG se absorba en tejido y alterar el impacto de CTF-IgG en células inmunitarias. Por lo tanto, esta medición puede usarse para identificar fármacos potenciales. Estas células también se pueden utilizar para el aislamiento de moléculas que se unen a CTF-inmunoglobulina para identificar nuevos fármacos potenciales.

20 Por ejemplo, el antígeno puede aislarse a partir de lisados celulares capturándolos sobre perlas de resina polimérica conjugadas con CTF-inmunoglobulina nativa como fase de captura. Los antígenos purificados por afinidad se liberan de las perlas.

Ejemplo 7: Aislamiento de las inmunoglobulinas específicas que se unen a CTF-inmunoglobulina y antígenos

25 El CTF unido a inmunoglobulina y otras proteínas puede usarse para producir anticuerpos monoclonales. También, los antígenos purificados por afinidad para la CTF-inmunoglobulina nativa pueden usarse para fabricar anticuerpos monoclonales (inmunoglobulina).

30 Los anticuerpos monoclonales para estos antígenos se elaboraron fusionando células de mieloma con las células de bazo de un ratón que se ha inmunizado con el antígeno sobre unas proteínas portadoras estándar tales como hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OA) o similares. Las células productoras de anticuerpos se fusionan con células que crecen continuamente en cultivo para formar hibridomas en medio HAT de cultivo selectivo. El medio de cultivo selectivo se denomina medio HAT porque contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. Este medio es selectivo para células fusionadas (hibridoma). Un hibridoma único que produce sólo un anticuerpo para un antígeno fueron el aislamiento. El único hibridoma se divide para producir una gran población de "clones", todos fabricando el mismo anticuerpo "monoclonal". Los hibridomas vivos se congelan indefinidamente en nitrógeno líquido.

Ejemplo 8: Aislamiento de antígenos específicos para CTF-inmunoglobulina

40 Los anticuerpos monoclonales pueden usarse para aislar antígenos específicos para CTF-inmunoglobulina por purificación de antígeno celular capturando sobre perlas de resina polimérica conjugadas con anticuerpos monoclonales específicos del Ejemplo 6. El kit de acoplamiento de proteínas PolyLink (Bangs Laboratories Inc.) puede ser utilizado para esta conjugación. También se pueden emplear otras perlas y partículas de captura comúnmente utilizadas. El antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal puede liberarse de la perla de captura mediante ajuste de pH. La pureza y la identificación se pueden establecer primero mediante transferencia Western para CTF-inmunoglobulina nativa y anticuerpos monoclonales del Ejemplo 6. Las bandas reactivas se pueden aislar y determinar la identidad por la secuencia peptídica de la cola del extremo terminal N o por espectroscopia de masas.

Ejemplo 9: Conjugación de CTF-inmunoglobulina

50 Se produjo CTF-inmunoglobulina se produjo mediante la unión de CTF R1 CTF25 SEQ ID NO: 11 al código de producto Fitzgerald de inmunoglobulina 30-A117) que une un péptido al extremo terminal C de otro péptido a través de ésteres de succinimida (por ejemplo, MBS, SMCC) que se une a grupos amino libres y residuos de cisteína. Estos materiales se usaron como estándares para los métodos ELISA. Este mismo proceso de unión de CTF puede hacerse con muchas otras inmunoglobulinas. Por ejemplo, aquellas aisladas del Ejemplo 6 u otra inmunoglobulina. Por ejemplo, los CTF se pueden unir a trastuzumab, fulvestrant, tosimumab, ibritumomab, imatinib, lenalidomida,

cetuximab, dasatinib, pantumumab, lapatinib y nilotinib. En la práctica, la IgG activada con maleimida se trató con las fracciones sulfhidrilo (-SH) sobre el residuo de cisteína de CTF para producir CTF-inmunoglobulina sintética.

Ejemplo 10: Impacto de CTF-inmunoglobulina de la respuesta a la insulina y crecimiento celular.

5 Se encontró previamente que el CTF afectaba la respuesta a la insulina en modelos animales. La respuesta a la insulina se midió mediante pruebas de tolerancia a la glucosa en modelos animales como se ha descrito anteriormente (publicación internacional No. WO 2007/120.311). Los modelos animales tratados con CTF se compararon con un grupo no tratado para determinar la respuesta y la eficacia. De forma similar, los modelos animales pueden tratarse con CTF-inmunoglobulina aislada de muestras nativas o producidas como un conjugado sintético de CTF-inmunoglobulina. Los modelos animales también pueden tratarse con antígenos para CTF-
10 inmunoglobulina o inmunoglobulinas específicas para dicho antígeno.

La resistencia a la insulina y el crecimiento anormal de las células también se pueden medir usando modelos celulares. En general, se mantienen los cultivos celulares, tales como células cancerosas (por ejemplo, MCF, MDA SKBR), miocitos (C2C12) y células epiteliales de mono verde (VERO) (American Type Cell Culture, ATCC, Manassas, VA) en cultivo usando medio RPMI-1640, mientras que las células de miocitos y cáncer se mantienen con el medio de Eagle modificado (MEM). Ambos medios contenían glutamina 2 mM, penicilina (50 unidades/mL),
15 estreptomycin (50 µg/mL) y suero bovino fetal al 10% que contenía insulina y adiponectina. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ y se propagaron por división con 1 a 4 diluciones utilizando PBS/EDTA hasta confluencia del crecimiento celular. Las líneas celulares pueden sincronizarse y pueden inducirse (tratarse) con CTF-inmunoglobulina nativa; plasma con CTF-IgG, conjugado CTF sintético de inmunoglobulina, o con antígenos a CTF-inmunoglobulina o inmunoglobulinas para dichos antígenos.
20

La respuesta a la insulina en el cultivo de células tratadas se puede medir directamente uniendo insulina a los receptores de insulina o midiendo la pérdida de insulina intercelular. Menos unión a la insulina indica un menor nivel de receptores de insulina y la respuesta a la insulina. La unión al receptor se mide mediante la unión de células enteras a la placa de ELISA con incubación durante 12 h, lavando la placa con TBS, bloqueando con 200 µL de caseína bloqueadora en PBS (Thermo Fisher 37528) seguido de lavado con TTBS. Cada pozo se incubó con insulina-Biotina (5 ng/mL o 1,4 µM) en Tris 25 mM, HEPES 25 mM, NaCl 0,1 M y trehalosa al 10% ajustada a pH 7,5. Después de 1 h de incubación a 37°C, la placa se lavó con TTBS, se incubó durante otra hora con estreptavidina-ALP (0,3 mg/mL o 0,074 µM) y se lavó. Se midió la ALP unida añadiendo fosfato de para-nitrofenol.
25

La resistencia a la insulina o el crecimiento anormal de células en el cultivo de células tratadas puede medirse usando señales celulares causadas por la insulina. La insulina activa el transporte de glucosa, la síntesis de glicógeno, la síntesis de proteínas, la proliferación celular, la adhesión a la migración celular, la supervivencia, la síntesis de proteínas, la síntesis de nitróxido y la neuroprotección, a través de la señalización con PI3 quinasa/Akt y MAPK/Erk y la polimerización resultante de tubulina, degradación de beta cartenina, degradación de ciclina D1 y señalización con mTor. En general, la insulina controla la proliferación celular del cuerpo y acelera la entrada de glucosa en el hígado y los músculos, con la secreción de insulina determinada por el nivel de azúcar en la sangre. Por el contrario, las señales de adiponectina, como la leptina y el receptor alfa-adrenérgico, aumentan la captación de glucosa, la glicólisis, la oxidación de ácidos grasos, la presión sanguínea y el flujo; y disminuye la síntesis de glicógeno, gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos, síntesis de esteroides, lipólisis, proliferación celular a través de la síntesis de AMPK, en general, la quema de la energía corporal y detener el almacenamiento prolongado de energía.
30
35
40

Los ensayos de fosforilación de quinasa se pueden llevar a cabo generalmente añadiendo células a los pozos de la placa de microtitulación y fijándolas con 100 µL de formaldehído al 4% en PBS. Las placas se mantuvieron durante 20 minutos adicionales a temperatura ambiente y luego se cubrieron con una película de parafina y se almacenaron a 4°C hasta el ensayo. Las mediciones de ELISA del aumento relativo de fosforilación de Akt y PIK3 se realizaron de acuerdo con la instrucción del fabricante de ELISA (Superarray, Frederick, MD). Las mediciones del aumento relativo en la fosforilación de ERK de MAPK se realizaron de acuerdo con la instrucción del fabricante de ELISA (Assay Designs, Ann Arbor, MI). Los resultados se repitieron en 3 experimentos independientes con nuevos cultivos. Las células se fijaron a la placa de microtitulación seguido por la eliminación del regulador de fijación y la inactivación celular realizada con H₂O₂ y NaN₃. El eliminó el regulador de inactivación y se calentó, lavó y bloqueó la placa. Esto fue seguido por 1 hora de incubación con anticuerpos primarios para Akt, Phos-Akt, PI3K y Phos-PI3K (dilución 1:100). Cada anticuerpo y condición de inducción se ensayó en pozos separados por triplicado. Los anticuerpos primarios no unidos se eliminaron por lavado y la placa se incubó luego durante 1 h con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (dilución 1:16). La placa se lavó dos veces y se añadió solución de revelado. Después de la incubación, se leyó a 450 nm el color azul oscuro resultante formado después de la adición de la solución de detención.
45
50
55

La resistencia a la insulina o el crecimiento celular anormal también se puede medir por señalización de apoptosis celular. La señalización de la apoptosis es inhibida por el factor nuclear mejorador de la cadena ligera kappa de las células B activadas (NF-kappaB), que es controlado por el factor de necrosis tumoral (TNF alfa). La señalización de

la apoptosis es inhibida por la fosforilación de PI3 quinasa/Akt quinasa, que es controlada por la insulina. Por lo tanto, la resistencia a la insulina inducida por CTF y la inhibición de CTF inhibieron la liberación de TNF alfa, ambos favoreciendo la señalización de apoptosis.

5 La señalización de apoptosis es un mecanismo de suicidio celular regulado caracterizado por condensación nuclear, encogimiento de células, burbujas en la membrana y fragmentación del ADN. La activación de la apoptosis puede medirse por activación de caspasa proteasas, a saber, caspasa 3, 5, 6 y 9. Estas caspasas son los reguladores centrales de la apoptosis y son una medida definitiva de la apoptosis ejecutada. La señalización de apoptosis también se puede medir mediante el análisis de fosfatidilserina usando sensores fluorescentes, una medida de los cambios de membrana durante el proceso de apoptosis (B.D. Smith, Cell Death and Differentiation 2003; 10, 1357-9).

10 Los ensayos de apoptosis por activación de caspasa se llevan a cabo generalmente utilizando diversos extractos celulares y sobrenadantes. Las transferencias de Western se realizaron contra anticuerpos anti-caspasa (3/8/9) (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA). La electroforesis se realizó en condiciones estándar utilizando regulador Tris-Glicina-SDS a 18-20 mA con 3 µg de estándares BioRad previamente teñidos. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa a 80 V durante 1 hora o 40 V durante la noche a 4°C. Las proteínas transferidas se hicieron reaccionar con los anticuerpos específicos (1 mg/mL) mencionados anteriormente después de 1 hora de bloqueo con un bloqueador de caseína. Después de lavar el anticuerpo no unido y bloquear con TBS que contenía Tween20, las membranas con la transferencia se incubaron con el segundo anticuerpo correspondiente conjugado con ALP durante otra hora. Por último, se controló la reactividad cruzada de las muestras con los anticuerpos mediante la adición de 66 µL de tetrazolio nitro azul (50 mg/mL de DMF al 70%) y 35 µL de fosfato de bromo cloro indolilo (50 mg/mL de DMF, 100%) en 10 mL de TBS.

25 Los ensayos de apoptosis que usan análisis de fosfatidil serina se llevan a cabo generalmente utilizando células viables. Las células inducidas se trataron con colorante PSS-380 para reconocer la fosfatidilserina en el foliolo externo de las células apoptóticas (9). Las células se sembraron sobre el sistema de microportaobjetos Falcon (Fisher) y se lavaron 2 veces con regulador TES (ácido N-tris [Hidroximetil]-2-aminoetanosulfónico 5 mM: TES, NaCl 150 mM, pH 7,4), seguido por incubación con 200 µL del nuevo regulador TES que contenía PSS-380 25 µM a 37°C durante 10 minutos. El regulador se retiró después de la tinción, y las células se lavaron con regulador TES una vez antes de la observación de la fluorescencia. Las imágenes de contraste de fases se utilizaron para localizar regiones de señales fluorescentes y para calcular el porcentaje de células afectadas.

30 El resultado esperado del cultivo de células cancerígenas inducido con CTF-inmunoglobulina nativa; CTF-inmunoglobulina sintética, antígenos para CTF-inmunoglobulina e inmunoglobulina específica para dicho antígeno se muestran a continuación en la Tabla 18.

Tabla 18. Impacto sobre la respuesta a la insulina y crecimiento celular

	Respuesta a la insulina	Crecimiento celular
Normal	Línea base	Línea base
CTF-inmunoglobulina nativa	Disminuye	Disminuye
CTF-inmunoglobulina sintética	Disminuye	Disminuye

Ejemplo 11 Impacto de inmunoglobulina-CTF en la medición de CTF

35 Las muestras de plasma se midieron mediante tres ensayos para CTF. Estos tres ensayos se comparan en la Tabla 16. El primer ensayo fue un ensayo en sándwich para CTF libre usando un método de ELISA con un anticuerpo monoclonal para CTF y un anticuerpo policlonal para CTF conjugado con ALP.

40 El segundo ensayo fue un ensayo en sándwich para CTF libre no unido covalentemente a albúmina usando un método de ELISA con un anticuerpo monoclonal para CTF y un anticuerpo policlonal para albúmina humana conjugada con ALP. Se encontró que la molécula de CTF libre se asociaba y se unía fuertemente de una manera "no covalente" a la albúmina. Como resultado, casi todo el CTF libre en el plasma está asociado con albúmina. La unión de la albúmina se confirmó tratando el plasma con CTF unido a una perla de captura. Las proteínas unidas a CTF se disociaron (rompieron) en transferencia Western con electroforesis en gel desnaturizante con SDS y se secuenciaron los últimos pocos péptidos de los extremos terminales N para identificar la proteína de unión como albúmina. Este enlace no se rompió en un inmunoensayo de CTF libre.

45 El tercer ensayo fue un ensayo en sándwich para CTF unido covalentemente a cadenas de inmunoglobulina usando un método de ELISA con un anticuerpo monoclonal para CTF y un anticuerpo monoclonal o policlonal para cadenas de inmunoglobulina humana conjugadas con ALP. Se encontró que la molécula de CTF estaba unida

5 covalentemente "y no sólo asociada". Como resultado, casi todo el CTF unido a inmunoglobulina en plasma no puede ser disociado (roto) en transferencia Western con o sin desnaturalización o en un inmunoensayo. Cuando la albúmina asociada con CTF puede ser disociada (rota) en transferencia Western con desnaturalización o en un procedimiento de lavado de inmunoensayo. El lavado permite eliminar esta asociación de interferencia de la albúmina. La cantidad de IgG CTF en sangre humana está en gran exceso con respecto a la cantidad de CTF o CTF libre asociado con albúmina. Por lo tanto, tanto el impacto de CTF libre como de albúmina se reducen y no se producen interferencias con el ensayo de IgG CTF.

10 Una comparación del desempeño clínico de estos ensayos se muestra a continuación en la Tabla 16. Los tres inmunoensayos se utilizaron para analizar 100 muestras de plasma de pacientes y los resultados se compararon con los estándares. Los ensayos CTF libre y CTF de albúmina utilizaron péptido CTF sintético como estándar y para calibración y el ensayo de CTF-inmunoglobulina uso péptido CTF sintético conjugado con IgG humana. El inmunoensayo ideal para la prueba de muestras clínicas mantendría una alta correlación ($R^2 > 0,95$) con el estándar y no sufriría un aumento en el fondo (aumento $< 10\%$ en los límites de detección causado por la interferencia en la muestra clínica).

15 Tabla 19. Comparación de métodos

Ensayo	Incremento de fondo en el límite de detección (%)	Pendiente de correlación (R^2)	Interferencia por CTF-IgG	Interferencia por CTF	Interferencia por Albumina
Ensayo CTF libre	Hasta 1762%	0,90	Si	No	Si
Ensayo de CTF-inmunoglobulina	8%	0,98	No	No	No
Ensayo CTF- albumina	Hasta 256%	0,85	Si	Si	No
ideal	$< 10\%$	0,95	No	No	No

El ensayo para CTF-inmunoglobulina no sufrió interferencia y fue adecuado para ensayos clínicos.

Ejemplo 12: Preparación de anticuerpos monoclonales

20 Se inmunizaron ratones BALB/c con 100 μg /ratón de una composición sintética de inmunógeno peptídico AdipoR1 o AdipoR2. Estas composiciones de inmunógeno peptídico AdipoR1 o AdipoR2 se incluyen como se muestra en la Tabla 20:

Tabla 20 Método de comparación

SEQ ID NO:	AdipoR	Clon de anticuerpo	Secuencia de aminoácidos
49	1	461-4H11	HVLVVAAAFVHFCYS
50	1	444-1D12	HFYGVSNLQEFYRGLEGGCTDDSL
51	1	515-4D6	GGCTDDTLL
52	2	510-6B6	GGCSEEDAL

25 Después de un mes, se tomaron muestras de sangre oculares de cada ratón y se tituló por ELISA contra el inmunógeno para evaluar la respuesta inmune. Los ratones que mostraron la mejor respuesta recibieron refuerzo mediante inyección de 100 μg /ratón con el inmunógeno. Después de cuatro días, los ratones fueron sacrificados y se usaron sus bazo para fusión de acuerdo con el método de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma SP2-0 Ag14 usando solución de PEG (polietilenglicol) con una relación de células esplenocitos con respecto a células de mieloma de 5:1 y se sembraron en placas de 96 pozos

usando PEG/ medio de crecimiento HAT al 50%. Después de 7-10 días de incubación a 37 grados Celsius, se contralaron los cultivos de fusión para el crecimiento alimentando cada 3-4 días utilizando el método de selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) seguido de subcultivo con medio de crecimiento HAT.

5 Después de 2-3 semanas, los pozos que tienen crecimiento de colonias de hibridoma se ensayaron mediante ELISA para determinar qué crecimientos produjeron una respuesta inmune de anticuerpo con el péptido. Los cultivos de placas de 96 pozos se ensayaron con el péptido uristatina en placas revestidas con 100 µg/mL. Después de recubrir las placas durante la noche a 2-8°C, todas las placas se lavaron y se bloquearon. A continuación, se aplicaron los sobrenadantes del cultivo celular a razón de 100 µL/pozo durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, se aplicó anti IgG de cabra-peroxidasa de rábano picante a una dilución 1:2000 a razón de 100 µL/pozo durante una hora. Las placas se lavaron una vez más seguido por sustrato de OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina) y se leyó a 490 nm en un lector de placas Spectra Max.

15 Las colonias que dieron una respuesta positiva se transfirieron a placas de 24 pozos para su posterior expansión y se ensayó nuevamente para verificar los resultados positivos. Las colonias que dieron resultado positivo se expandieron 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, las colonias se congelaron a -70°C y luego se transfirieron a nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo. Con base en los resultados de ELISA usando el péptido purificado, adicionalmente se expandieron varios clones en IMDM, FBS al 10% y se congelaron.

20 Las células productoras de anticuerpo elaboradas usando el protocolo anterior se depositaron en la American Type Culture Collection ("ATCC") (10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 21 de febrero de 2012 y se les asignó el número de acceso PTA-12562 para las células productoras de mAb 461-4H11, número de acceso PTA-12564 para las células productoras mAb 444-1D12, número de acceso PTA-12563 para el clon 515-4D6 y el 2 de marzo de 2012 y se les asignó el número de acceso PTA-12625 para células que producen 510-6B6.

Ejemplo 13: Protocolo de ensayo de unión

25 Estos métodos pueden usarse para medir IgG-CTF en un estudio de correlación para resistencia a la insulina. Los materiales incluyen el anticuerpo anti R1 CTF mAb 444-1D12-1h7 a una concentración de 2,5 mg/mL, se diluyeron 150 µL del anticuerpo en 10 mL de TBS para recubrimiento de la placa. Alternativamente, se diluyeron 300 µL del anticuerpo anti-R1 CTF mAb 461-4H11.2A4 a una concentración de 1,25 mg/mL del anticuerpo en 10 mL de TBS para recubrimiento de la placa. Alternativamente, se diluyeron 1000 µL del anticuerpo anti-R2 CTF mAb 510-6B6-1G11 a una concentración de 0,47 mg/mL del anticuerpo en 100 mL de TBS para el recubrimiento de la placa. El anticuerpo anti-IgG humano conjugado con ALP (anti-IgG ALP) [anticuerpo monoclonal Anti-Fab Humano producido en ratón por Siemens como el producto 7601MR se conjugó con fosfatasa alcalina (ALP) (Biozyme ALP112G lote 1662AA)]. El anti-IgG ALP se purificó en forma de una solución patrón de 0,3 mg/mL que se diluyó a 25 µL en 10 mL de T-TBS al 0,05% para su uso en el ensayo. El estándar de ensayo se preparó a partir de IgG humana (código de producto Fitzgerald 30-A117) conjugado con CTF R1 25mer (SEQ ID NO: 11) como se describe en el Ejemplo 9. Se preparó TBS sin Tween a partir de solución salina regulada con BupH Tris catálogo No PI-28376) y es tris 25 mM y cloruro de sodio 0,15 M a pH 7,2. El bloqueador de bloqueo fue Superbloqueador y se usó tal como se suministró (Pierce), se preparó T-TBS añadiendo Tween-20 al 10% (Bio-Rad Catalogo # 161-0781) en TBS para elaborar Tween-20 al 0,05%. El regulador de calibrador fue PBE con BSA al 1% (Sigma P3688) con 1,92 g/L de citrato (0,1 M) pH ajustado a 6,4. Para la lectura del inmunoensayo, se utilizó una placa de ELISA de 96 pozos (Costar catálogo No. 3590), placa de EIA con fondo plano y alta unión Fisher Catalogo No. 07-200-35. Para el almacenamiento se utilizaron viales criogénicos Corning de 1,2 mL catálogo No. 430658. Se utilizaron también tubos de plástico BD Vacutainer K2EDTA de 10,8 mg estériles referencia 367893 y heparina sódica, tubo de vidrio referencia 8091437 y tubos de glucosa de tapa gris.

45 la primera etapa consistió en recubrir ocho placas (Placas fondo plano EIA/RIA de 96 pozos Costar; alta unión) con un mAb para CTF a una concentración de 12 µg/mL en TBS. Se aplicó una solución de revestimiento de 100 µL/pocillo a la placa. La placa se selló y se dejó incubar en el refrigerador (4°C) durante la noche (~ 5pm a ~9am) o durante 3 horas a temperatura ambiente. La solución de recubrimiento se desechó pipeteando para drenarla completamente. Las placas que se almacenan no se lavaron y se sellaron con un sellador de placa (Fisher Scientific Catalogo No. NC9479592) y se pusieron en una bolsa sellada con un desecante. Se almacenaron -20°C hasta el día de su uso. Las placas recubiertas duraron tres meses.

50 La segunda etapa fue el bloqueo de la preparación de una placa para 40 pacientes. Cada pozo se lavó 5 veces con 300 µL de TBS, usando una lavadora de placas automatizada. A continuación, se añadieron 300 µL de Superbloqueador a cada pozo para el bloqueo. La placa se incubó con una velocidad de agitación de 1000 rpm (posición 5) a 37,5°C durante 60 minutos. La placa se lavó 5 veces con 300 µL de T-TBS al 0,05%, usando un lavador automático de placas.

5 La tercera etapa era preparar el calibrador de muestra realizando las siguientes diluciones de reactivo CTF sintético concentrado (20 μL de IgG-CTF a 18,8 mg/ μL en 10 mL de PBS) para elaborar un estándar. Este estándar se puede almacenar (por ejemplo, refrigerado) durante 3 meses. Los calibradores se elaboraron en regulador calibrador (PBS + Citrato + BSA al 1% a pH 6,4). Los calibradores deben elaborarse frescos todos los días. Los calibradores se elaboraron de acuerdo con la Tabla 21.

Tabla 21.

Calibrador	Concentración	Dilución
5	0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Estándar de 300 μL para 700 μL de regulador calibrador
4	0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Calibrador 5 de 300 μL para 300 μL de regulador calibrador
3	0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Calibrador 5 de 100 μL para 400 μL de regulador calibrador
2	0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Calibrador 5 de 50 μL para 450 μL de regulador calibrador
1	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Regulador calibrador

10 La cuarta etapa fue preparar las muestras de los pacientes. Se añadieron 50 μL de muestras (43 por placa) en pozos de carril por duplicado en las placas de muestra de polipropileno. Se añadieron 600 μL de TBS y se mezclaron bien (la placa se puede almacenar en este punto a 4°C durante hasta 5 días o -20°C durante al menos 5 días. 50 μL de muestra diluida (1:12) y 50 μL de calibrador se transfirieron a pozos individuales de placas de ELISA bloqueadas.

15 La quinta paso fue la unión de inmunoensayo y el lavado de una placa a la vez. La placa se selló y se incubó con una velocidad de agitación de 1000 rpm a 35°C durante 60 minutos. La placa se lavó 5 veces con T-TBS al 0,05% usando un lavador automático de placas. Se aplicaron 100 μL de mAb de anti-IgG-fosfatasa alcalina a cada pozo en T-TBS al 0,05%. Las placas se sellaron y se incubaron con una velocidad de agitación de 1000 rpm a 35°C durante 60 minutos. Las placas se lavaron 5 veces con T-TBS al 0,05% usando un lavador automático de placas.

20 La sexta etapa fue la unión del inmunoensayo y el lavado de una placa a la vez. Se preparó sustrato de PNPP (Sigma catálogo No N189) fresco por disolución de 1 comprimido de plata y 1 paquete de comprimidos en 10 mL de regulador PNPP a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 90 μL de PNPP a cada pozo. Las placas se colocaron en el lector de placas y se incubaron a 37°C leyendo la placa durante 16 minutos usando absorbancia a 405 nm/950 nm cada 2 minutos.

Ejemplo 14: Cáncer y tinción de células sanguíneas y tinción de muestras de tejidos para aislamiento de tejidos

25 Los siguientes son materiales de anticuerpos que pueden usarse para la prueba de tejidos. Se usaron para tejidos de ratas y conejos. mAb monoclonal anti-CTFR1-FITC de ratón (clon 444-1D12 Ekhart IN) a 2,58 mg/mL (F a P 4: 3) cuando se diluye 10 μL en 10 mL de PBS. Se utilizó mAb monoclonal anti-CTFR1 de ratón (clon 461-4H11 Ekhart IN) pAb de cabra FITC con mAb anti-ratón de 1,0 mL a razón de 2 mg/mL (clon UCHL1 PE ab6785 Abcam Inc.). Se utilizó mAb de ratón anti-TACE (ADAM17) (R&D Systems MAB2129) con anticuerpo policlonal de cabra FITC anti-ratón conjugado con FITC (Abcam ab6785). Se utilizó pAb de cabra Anti-IDE (insulinsina) (R&D Systems AF2496) con anticuerpo policlonal de burro FITC anti-cabra conjugado con FITC (Abcam 97109).

35 Los siguientes son métodos que se pueden usar para el aislamiento de células. El material celular se filtró a través de una membrana de poro de 8 μm que permite el paso de glóbulos rojos. Las membranas se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia de barrido para encontrar las células que se unen a CTF-inmunoglobulina nativa usando: Anti-CD45 TR (Ekhart IN) con mAb monoclonal de ratón Anti-CTFR1-FITC, Anti-CD19 TR (Abcam) con mAb monoclonal de ratón, anti-CTFR1-FITC, anti-CD 3 TR (Abcam) con mAb monoclonal de ratón anti-CTFR1-FITC. Las células se retiraron entonces de la membrana usando un micromanipulador Transferman Eppendorf.

40 Los siguientes son materiales que se pueden usar para ensayo modelo de células cancerosas humanas (véase el Ejemplo 10 para células cancerosas en crecimiento): se usaron 2,3 mL de mAb monoclonal de ratón anti-CTFR1-FITC (clon 444-1D12 Ekhart IN) a razón de 2,58 mg/mL F a P 4:3 para células que se mostraron negativas, se usó pAb de conejo (calibiochem ST1120) anti-IDE (insulinsina) mezclado con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo TR para ratón conjugado con TR (Abcam Ab 6716) para ensayo modelo de células SKBR, se usó también pAb de conejo anti-TACE (calibiochem PC491) con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo TR conjugado con TR (Abcam Ab 6716) para pruebas de modelo de células SKBR, se usaron pAb de conejo Anti-IDE Anti IDE Múltiple (insulinsina)

(calbiochem ST1120) para los modelos celulares con anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo TR para ratón conjugado con TR (Abcam) mezclado con pAb de pollo anti-IDE TACE (ADAM17) (R&D Systems AF930) utilizada para modelos celulares con anticuerpo policlonal de cabra anti-pollo Cy5 para ratón conjugado con Cy5 (Abcam) utilizado como ensayo multiplex para el ensayo modelo de células SKBR.

- 5 Los siguientes son los materiales que pueden usarse para bloqueo: anticuerpos anti-Fc-Receptor producido en conejo (Abcam), anticuerpo anti-CD32 producido en conejo, anticuerpo anti-Fc- γ RII-a producido en conejo, anticuerpo anti-Fc- γ RIIa producido en conejo, anticuerpo anti-FcRII-a producido en conejo, anticuerpo anti-IgG Fc receptor II-a producido en conejo, anticuerpo precursor anti-inmunoglobulina γ de baja afinidad región receptor IIa Fc producido en conejo, anticuerpo anti-humano conjugado con ALP (anti-IgG ALP): los siguientes materiales que se usaron típicamente para bloqueo, gamma globulina IgG humana fracción Cohn (G4368 Sigma Aldrich).

Los siguientes son materiales y tejidos generales: Tubos de centrifuga Nalgene 50 mL (# 3110-9500) con tapa.

- 15 Se aislaron páncreas, hígado, grasa y músculo cuádriceps de ratas ZDF y se usaron para estudios de sonicación de tejido (se utilizó Sonicato Misonix Inc Sonicaton XL 2010). Se aisló un segundo conjunto de tejido de ratas ZDF que incluye hígados y ganglios linfáticos. El páncreas, cerebro, hígado, grasa y músculo cuádriceps se aislaron de los conejos tratados durante el desarrollo policlonal y se usaron para crioprotectores (laboratorios AML) con cortes separados obtenidos del hemisferio cerebral izquierdo y derecho y del cerebelo. El tejido se perfundió con PBS al momento de la recolección. El tejido se embebió para cortes de tejido congelados con (compuesto OCT) y se colocó en una base desechable (catalogo No 22.363.544) en un baño de hielo y luego se congelaron a -70°C. Los conejos 20 464, 465 y 466 se inocularon con hemocianina de lapa de cerradura KLH CTF33 (SEQ ID NO: 1), y eran respondedores, todos elaborando anticuerpos policlonales contra CTF. Mientras que los Conejos 467, 468 y 469 fueron inoculados con BSA CTF33 (SEQ ID NO: 1) y eran no respondedores, no elaboran anticuerpos policlonales contra CTF. Los conejos se juzgaron como respondedores o no respondedores usando R1 CTF25 (SEQ ID NO: 11). La solución de permeación celular era Triton X100 al 0,02% en PBS. Solución de lavado celular: Diluir 1 a 10 en PBS para preparar PBS/Tween 20 al 0,1%. DAPI: 4,6 diclorhidrato 4,6-diamidino-2-fenilindol PM 350,25. DAPI viene en un vial de 1 mg. Disolver el DAPI en 1 mL de TES para obtener 1 mg/mL. La solución patrón de DAPI es estable durante varios meses y para uso repetido si se almacena protegido de la luz a -20°C. La solución de trabajo DAPI se hace diluyendo la solución madre DAPI 1:10 en TES (100 μ g/mL de DAPI). Células cancerígenas: células de cáncer de mama (ATCC) se cultivaron como se describe en el ejemplo 10 y se crecieron hasta una concentración de aproximadamente 200.000 células/mL. Las células se diluyeron 10 μ L en 1 mL para proporcionar aproximadamente 2000 células/mL, o 2 células/ μ L o 0,5 por HRP (HRP = 0,2 μ L). La microscopía se realizó mediante contraste de fases y microscopía de fluorescencia con un microscopio Leica DM5000. Los cubreobjetos utilizados fueron cubreobjetos Permafrost Fisher 12-548-6.

Los filtros usados en microscopía se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22.

Filtros	Filtro de excitación	Filtro de emisión	Señal de fluorescencia
A4	340-380 BP	450-490 BP	A4 DAPI
TX2	540-580 BP	610-680 BP	Rojo Texas 592, 614
L5	460-500 BP	512 -543 BP	FITC (ex 488, em 525 nm)
Y5			

- 35 **Cáncer y tinción de células sanguíneas**

- Se prepararon muestras de células añadiendo 100 μ L de suspensión celular a 1,0 mL de PBS con IgG o BSA al 5% en regulador de lavado para 20.000 células/mL (20 células/ μ L o 5 por HRP (HRP = 0,2 μ L)). (Esto también puede hacerse con sangre entera). Para garantizar que las células se distribuyeran uniformemente, las células se agitaron con vórtice. A 100 mL de estándar de prueba se le añadieron 20 μ L de DAPI (diluido 1: 10). Se añadieron 20 μ L de anticuerpo. Las células se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Las células se centrifugaron durante 10 min a 7500 rpm y el sobrenadante se decantó mediante toque (~450 μ L). Las células se lavaron con 1.000 μ L con PBS de lavado y se sometieron a vórtice. Las células se centrifugaron durante 10 min a 7500 rpm y el sobrenadante se decantó mediante toque (~450 μ L). Se añadieron 100 μ L de regulador de lavado PBS para la solución final de formación de imágenes. Se aplicó 5 μ L al portaobjetos con un cubreobjetos largo de vidrio. Se realizó microscopía de contraste de fases y fluorescencia con el microscopio Leica DM5000.

Tinción de muestras de tejido de rata para aislamiento celular

5 Se preparó una muestra de tejido de 100 mg de tejido con 1 mL de PBS y se sonicó a 240 vatios (40%) durante 1 h hasta que las células se distribuyeron uniformemente. Las células no se calentaron. En vez de eso, las células se refrigeraron. Se añadieron 5 µL de DAPI (diluido) a 100 µL de muestra de tejido. Se añadieron 10 µL de anticuerpo (no diluido) a la muestra y se incubaron durante 15 minutos a TA. La muestra se centrifugó durante 5 min a 7500 rpm y el sobrenadante se decantó mediante toque (~450 µL). Se añadieron 100 µL de regulador de lavado PBS para la solución final de formación de imágenes. Se aplicó 5 µL al portaobjetos con un cubreobjetos largo de vidrio. Se realizó microscopía de contraste de fases y fluorescencia con el microscopio Leica DM5000.

Tinción de muestras de tejido de rata para fijación de tejidos

10 Se prepararon muestras de tejido con 100 mg de tejido con 1 mL de PBS. La muestra se sonicó a 240 vatios (40%) durante 15 min a 30 min hasta que los tejidos se adelgazaron. El tejido no se calentó. Por el contrario, se refrigeró para enfriarlo. El tejido de proceso se añadió a portaobjetos de microscopio y las áreas de tejido fueron circundadas con pluma hidrófoba para crear un área para retener líquido. Se añadieron 100 µL de formaldehído al 5% en PBS al área del círculo y la lámina se incubó durante 15 minutos a TA. Las placas se lavaron a continuación en regulador de permeabilización (PBS/Triton X 100 al 0,2%) en un baño de lavado durante 5-15 minutos. Se retiraron los lados y se dejó que los portaobjetos se secaran por goteo y los receptores Fc en los tejidos se bloquearon añadiendo 50 µL de IgG al 5% en PBS (5 mg/mL) al área circundada del portaobjetos y se permitió que el portaobjetos permaneciera durante 15 minutos a TA. Los portaobjetos se retiraron y se lavaron en lavado celular (PBS/Tween 20 al 0,1%), sumergiendo los portaobjetos en un baño de lavado durante 5 min. Se retiraron los portaobjetos (podría tener que volver a aplicar la pluma) y se añadieron 50 µL de tinción al área del círculo. La tinción se preparó a partir de (2,0 mL de PBS, 100 µL de DAPI (diluido hasta 0,01 mg/mL)) y 100 µL de anticuerpo (diluido hasta 0,1 mg/mL) y se añadió. El portaobjetos se incubó durante 15 min a 37°C y luego se retiró. El portaobjetos se lavó a continuación en regulador de lavado celular (PBS/Tween 20 al 0,1%), sumergiendo los portaobjetos en un baño de lavado durante 5 min. Se realizó microscopía de contraste de fases y fluorescencia con el microscopio Leica DM5000.

Tinción de muestras de tejidos de conejo para fijación de tejidos

25 Las rebanadas de tejidos para el microscopio pueden prepararse de acuerdo con cualquier práctica común en la técnica. Las rebanadas se elaboraron como criorebanadas de 8 µm en tejidos perfundidos y los tejidos en los portaobjetos fueron circundados con pluma hidrófoba para crear un área para retener líquido. Se añadieron 100 µL de formaldehído al 5% en PBS al área del círculo y el portaobjetos se incubó durante 15 minutos a TA. Las placas se lavaron a continuación en regulador de permeabilización (PBS/Triton X-100 al 0,2%) en un baño de lavado durante 30 5-15 minutos. Se retiraron los lados y se dejó que los portaobjetos se secaran por goteo y los receptores Fc en los tejidos se bloquearon añadiendo 50 µL de IgG al 5% en PBS (5 mg/mL) a la zona circundada del portaobjetos y permitiendo que el portaobjetos permanezca durante 15 min a TA. Los portaobjetos se retiraron y se lavaron en lavado celular (PBS/Tween 20 al 0,1%), sumergiendo los portaobjetos en un baño de lavado durante 5 min. Se retiraron los portaobjetos (se puede volver a aplicar la pluma) y se añadieron 50 µL de un colorante al área circular. 35 La tinción se preparó a partir de (2,0 mL de PBS, 100 µL de DAPI (diluido a 0,01 mg/mL)) y se añadieron 100 µL de anticuerpo (diluido a 0,1 mg/mL). El portaobjetos se incubó durante 15 min a 37°C y luego se retiró. El portaobjetos se lavó a continuación en regulador de lavado celular (PBS/Tween-20 al 0,1%) sumergiendo los portaobjetos en un baño de lavado durante 5 min. Se realizó microscopía de contraste de fases y fluorescencia con el microscopio Leica DM5000.

40 Listado de secuencias

<110> SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS, INC.

<120> FRAGMENTOS DEL EXTREMO TERMINAL C DEL RECEPTOR DE ADIPONECTINA (CTF) -
IMUNOGLOBULINA

<130> SMSD-0095

45 140>

<141>

<150> 61/445,103

<151> 2011-02-22

<160> 52

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 1

Val Leu Val Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn
1 5 10 15

Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr
20 25 30

Leu Leu

10 <210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

Leu Val Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu
1 5 10 15

Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu
20 25 30

Leu

<210> 3

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 645 228 T3

<400> 3

Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp
1 5 10 15

Asp Thr Leu Leu
20

<210> 4

<211> 32

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 4

Val Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln
1 5 10 15

10

Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20 25 30

<210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 5

Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu
1 5 10 15

Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20 25 30

<210> 6

20 <211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 645 228 T3

<400> 6

Ala Ala Ala Phe Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe
1 5 10 15

Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20 25 30

<210> 7

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 7

Ala Ala Phe Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg
1 5 10 15

10 Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20 25

<210> 8

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 8

Ala Phe Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr
1 5 10 15

Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20 25

<210> 9

20 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 645 228 T3

<400> 9

Phe Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly
1 5 10 15

Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20 25

<210> 10

<211> 26

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 10

Val His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu
1 5 10 15

10 Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20 25

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 11

His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu
1 5 10 15

Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20 25

<210> 12

20 <211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 645 228 T3

<400> 12

Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20

<210> 13

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 13

Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly
1 5 10 15

10 Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 14

Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys
1 5 10 15

Thr Asp Asp Thr Leu Leu
20

<210> 15

20 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 645 228 T3

<400> 15

Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr
1 5 10 15

Asp Asp Thr Leu Leu
20

<210> 16

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 16

Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp
1 5 10 15

10 Thr Leu Leu

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 17

Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 18

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 18

ES 2 645 228 T3

Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu
1 5 10 15

Leu

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 19

Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
1 5 10 15

10 <210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 20

Phe Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
1 5 10 15

<210> 21

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 21

25 Arg Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

ES 2 645 228 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 22

5 Tyr Gly Leu Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
1 5 10

<210> 23

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 23

Ile Phe Val Val Ala Gly Ala Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn
1 5 10 15

Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp
20 25 30

Ala Leu

<210> 24

15 <211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

20 <400> 24

Val Ala Gly Ala Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu
1 5 10 15

Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
20 25 30

<210> 25

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 645 228 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 25

```

Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu
1           5           10           15

Glu Asp Ala Leu
           20
    
```

5 <210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 26

```

Phe Val Val Ala Gly Ala Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu
1           5           10           15

Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala
           20           25           30

Leu
    
```

<210> 27

<211> 32

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 27

```

Val Val Ala Gly Ala Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln
1           5           10           15

Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
           20           25           30
    
```

20 <210> 28

<211> 30

<212> PRT

ES 2 645 228 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 28

Ala Gly Ala Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe
1 5 10 15

5

Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
20 25 30

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 29

Gly Ala Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg
1 5 10 15

Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
20 25

<210> 30

15

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

20

<400> 30

Ala Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe
1 5 10 15

Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
20 25

<210> 31

<211> 27

<212> PRT

ES 2 645 228 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 31

Phe Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met
1 5 10 15

5

Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
20 25

<210> 32

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 32

Val His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile
1 5 10 15

Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
20 25

<210> 33

15

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

20

<400> 33

His Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly
1 5 10 15

Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
20 25

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 34

Phe His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly
 1 5 10 15

5

Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
 20

<210> 35

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 35

His Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
 20

<210> 36

15

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

20

<400> 36

Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys
 1 5 10 15

Ser Glu Glu Asp Ala Leu
 20

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

ES 2 645 228 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 37

Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser
1 5 10 15

5

Glu Glu Asp Ala Leu
20

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 38

Asn Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu
1 5 10 15

Asp Ala Leu

<210> 39

15

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

20

<400> 39

Leu Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp
1 5 10 15

Ala Leu

<210> 40

<211> 17

25

<212> PRT

ES 2 645 228 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 40

Gln Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala
1 5 10 15

5 Leu

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 41

Glu Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
1 5 10 15

<210> 42

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

20 <400> 42

Phe Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
1 5 10 15

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 43

ES 2 645 228 T3

Arg Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
 1 5 10

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 44

Phe Met Ile Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
 1 5 10

10 <210> 45

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Pro Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

15 Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Lys Val
 65 70 75 80

ES 2 645 228 T3

Asp Ser Met Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Ala Phe Phe Asn Ala Tyr Asp Phe Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

ES 2 645 228 T3

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Val Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

<210> 46

<211> 134

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 46

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Asp
 65 70 75 80

ES 2 645 228 T3

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln His Thr His Trp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Arg Leu Glu Ile Lys Arg
130

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 47

Glu Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
1 5 10

10 <210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 48

Gly Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
1 5 10

<210> 49

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 645 228 T3

<400> 49

His Val Leu Val Val Ala Ala Ala Phe Val His Phe Cys Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 50

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 50

His Phe Tyr Gly Val Ser Asn Leu Gln Glu Phe Arg Tyr Gly Leu Glu
1 5 10 15

10 Gly Gly Cys Thr Asp Asp Ser Leu Leu
20 25

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 51

Gly Gly Cys Thr Asp Asp Thr Leu Leu
1 5

<210> 52

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 52

Gly Gly Cys Ser Glu Glu Asp Ala Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica, comprendiendo dicho método:
- 5 a. exponer una muestra biológica derivada de un sujeto de una primera especie a un primer anticuerpo de una segunda especie que se une preferentemente al Ig-CTF de la primera especie o un fragmento de unión al antígeno del mismo, formando una mezcla;
- b. exponer dicha mezcla a un segundo anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de una tercera especie que se une preferentemente al Ig de la primera especie; y
- 10 c. detectar el Ig-CTF presente en dicha muestra.
2. Un método para controlar el nivel del fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- a. detectar Ig-CTF en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- 15 b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con
- i. un estándar conocido; o
- ii. la cantidad de IgG-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior de tiempo.
- 20 3. Un método para diagnosticar la resistencia a la insulina en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- 25 c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido; y
- d. determinar si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con la resistencia a la insulina.
4. Un método para controlar la resistencia a la insulina en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- 30 a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con
- 35 i. un estándar conocido; o
- ii. la cantidad de Ig-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior; y
- d. determinar si el nivel de Ig-CTF del sujeto es indicativo de progresión, regresión o estabilización de la resistencia a la insulina.
5. Un método para diagnosticar cáncer en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:

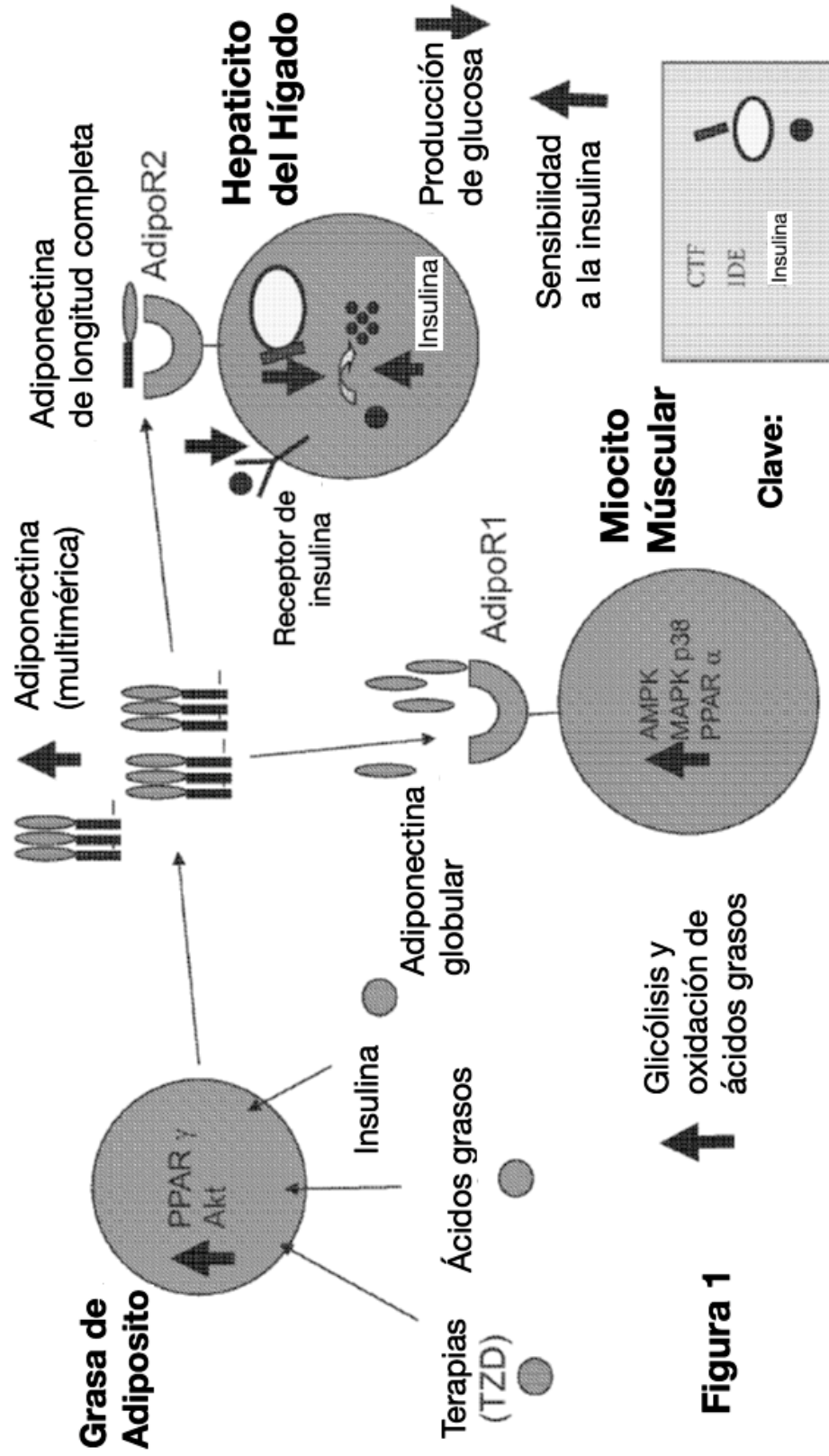
- a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- 5 c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido; y
- d. determinar si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con cáncer.
6. Un método para controlar el cáncer en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- 10 b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con
- i. un estándar conocido; o
- 15 ii. la cantidad de IgG-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior de tiempo; y
- d. determinar si el nivel de Ig-CTF del sujeto es indicativo de progresión, regresión o estabilización del cáncer.
7. Un método para diagnosticar una enfermedad hepática en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- 20 b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con un estándar conocido; y
- 25 d. determinar si la cantidad de Ig-CTF en la muestra cae dentro del nivel de Ig-CTF asociado con enfermedad hepática.
8. Un método para controlar una enfermedad hepática en un sujeto de una primera especie, comprendiendo dicho método:
- a. detectar un fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica del sujeto utilizando el método según la reivindicación 1;
- 30 b. cuantificar la cantidad de Ig-CTF presente en dicha muestra;
- c. comparar la cantidad de Ig-CTF presente en la muestra con
- i. un estándar conocido; o
- 35 ii. la cantidad de Ig-CTF presente en una muestra biológica obtenida del sujeto en un momento anterior de tiempo; y
- d. determinar si el nivel de Ig-CTF del sujeto es indicativo de progresión, regresión o estabilización de enfermedad hepática en dicho sujeto.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera especie, la segunda especie y la tercera especie no son la misma especie.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el Ig-CTF comprende un fragmento del extremo terminal C de AdipoR1 unido covalentemente a una Ig.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el fragmento del extremo terminal C de AdipoR1 comprende una o más de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22.
- 5 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el Ig-CTF comprende un fragmento del extremo terminal C de AdipoR2 unido covalentemente a una Ig.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 12, en el que el fragmento del extremo terminal C de AdipoR2 comprende una o más de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23 a 44.
- 10 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra biológica se deriva de orina, sangre, plasma sérico, saliva, ascitis, células circulantes, células tumorales circulantes, células que no están asociadas con tejido, tejidos, tejido hepático, tejido pancreático, tejido de ganglio linfático, tejido adiposo, tejido muscular, tejido cerebral, tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, muestras de aspiración con aguja fina, líquido cefalorraquídeo, glóbulos blancos, fluido intersticial o preparaciones histológicas.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho primer anticuerpo comprende:
 15 un anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-12564 (mAb 444-ID 12); o
 un anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC que tiene el número de acceso PTA-12563 (mAb-515-4D6).
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la Ig es IgG, IgA, IgM, IgD o IgE.
- 20 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la Ig es una cadena ligera kappa de IgG, IgM o IgA o una cadena pesada gamma de IgG o una región de unión al antígeno (Fab).
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que CTF libre no está siendo detectado.
- 25 19. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que la resistencia a la insulina está asociada con tolerancia alterada a la glucosa, prediabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes tipo 3, diabetes juvenil, diabetes gestacional o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
20. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer metastásico, cáncer de páncreas o carcinoma hepatocelular.
21. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que la enfermedad hepática es hepatitis autoinmune, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), o hepatitis alcohólica.
- 30 22. Un kit para detectar la presencia del fragmento del extremo terminal C de ADIPOR1 o ADIPOR2 unido covalentemente a inmunoglobulina, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina (Ig-CTF) en una muestra biológica, que comprende:
 35 a. un primer anticuerpo aislado que se une preferentemente a Ig-CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12564 (mAb 444-1 D12); y/o un primer anticuerpo aislado que se une preferentemente a CTF producido por la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-12563 (mAb-515-4D6);
 b. un segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une preferentemente a la Ig humana;
 y
 40 c. instrucciones para el uso del primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno junto con un envase para el mismo.
23. El kit de la reivindicación 22, en el que la Ig es IgG.

24. El kit de la reivindicación 22 o 23, en el que el segundo anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se marca de forma detectable.
25. El kit de la reivindicación 24, en el que el marcador detectable es un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador epitópico, biotina, un marcador cromóforo, un marcador electroquimioluminiscente (ECL) o una enzima, preferiblemente fosfatasa alcalina.
26. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en el que dicho primer anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está unido a un soporte sólido.
27. El kit de la reivindicación 26, en el que dicho soporte sólido es una placa de EIA/RIA.

5

Respuesta normal a la obesidad



Resistencia anormal a la insulina

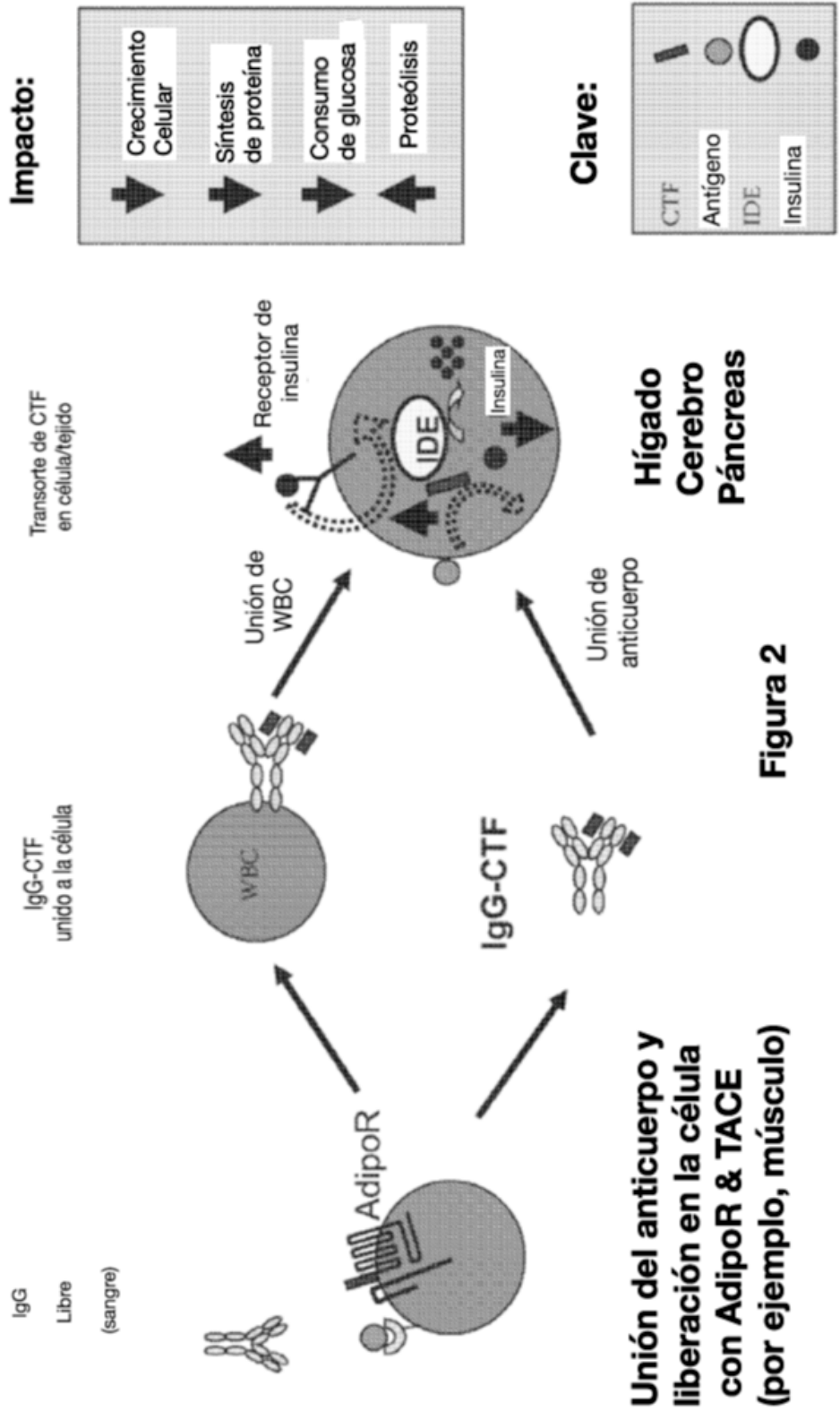


Figura 2

Figura 3a

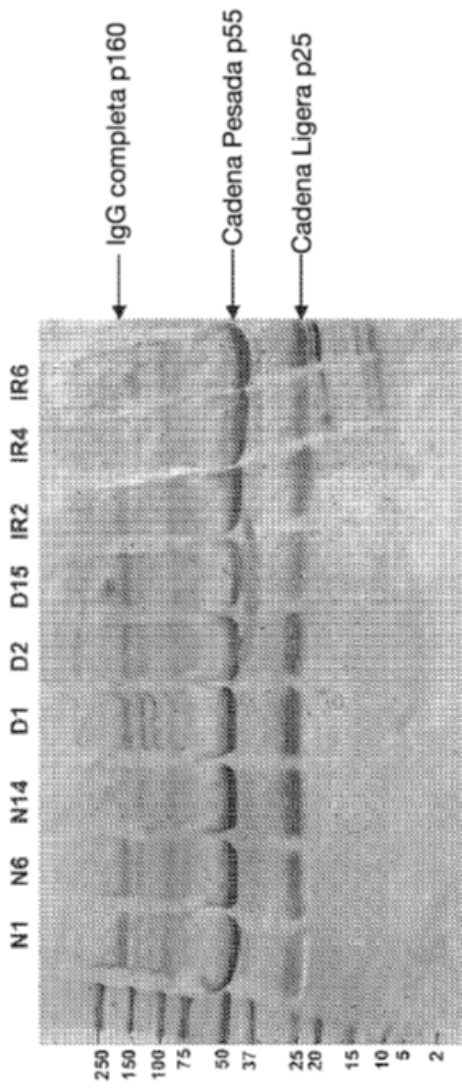


Figura 3b

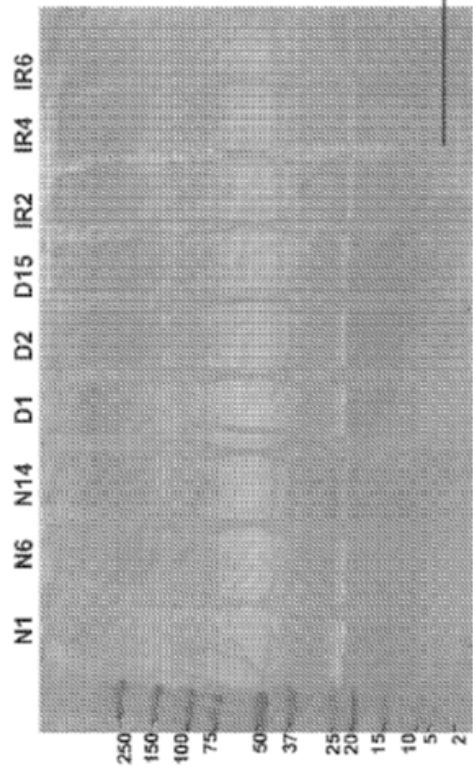


Figura 3c

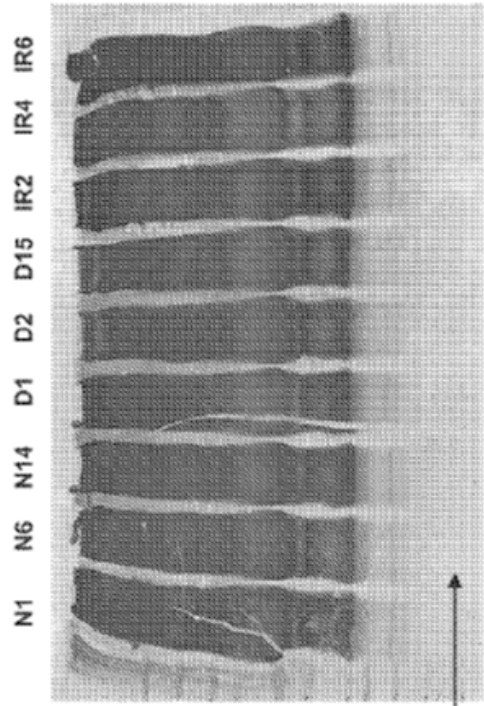


Figura 4

Imágenes de ejemplo

