



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 663**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02762796 .7**  
96 Fecha de presentación : **16.08.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1426764**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2004**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico o el control de un error sacarometabólico.**

30 Prioridad: **17.08.2001 JP 2001-248047**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.06.2011**

73 Titular/es: **Fujirebio, Inc.**  
**62-5, Nihonbashi Hamacho 2-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo, JP**

72 Inventor/es: **Tomita, Motowo;**  
**Nakano, Yasuko;**  
**Hirose, Hiroshi y**  
**Matsubara, Koichi**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 361 663 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

Procedimiento para el diagnóstico o el control de un error sacarometabólico.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para realizar el diagnóstico o control de trastornos del metabolismo de los carbohidratos mediante el ensayo de la adiponectina natural (GBP28) en una muestra, a un procedimiento para el control de los efectos terapéuticos de agentes para la diabetes de tipo II mediante el ensayo de GBP28 natural en una muestra, a un procedimiento para el ensayo de GBP28 caracterizado por el ensayo de GBP28 natural en una muestra, y a un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con GBP28 natural. La GBP28 natural presenta una estructura de trímero agregado constituido por 4 a 6 trímeros de GBP28 en su estado natural.

15 **Antecedentes de la técnica**

Existen 100.000.000 ó más pacientes que sufren diabetes en todo el mundo, y 90% o más de los mismos presentan diabetes de tipo II (Schoonjans K. y Auwerx J., *Lancet* 355:1008-1010, 2000). La diabetes de tipo II se caracteriza por alteraciones de la secreción de la insulina y/o resistencia a la insulina (DeFronzo R.A. *et al.*, *Diabetes Care* 15:318-368, 1992). Se ha descubierto tanto en experimentos animales como en estudios clínicos que las tiazolidinedionas mejoran la resistencia a la insulina. Al administrar dichos agentes en pacientes con diabetes de tipo II, se elevó la acción de la insulina. Esto resultó adversamente en niveles bajos de glucosa en sangre, de glucohemoglobina y de insulina sérica (Schwartz S. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 338:861-866, 1998).

La adiponectina, que es una proteína plasmática derivada del adipocito (Maeda K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221:286-289, 1996; Arita Y. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:79-83, 1999) (también conocida como proteína de unión a la gelatina de 28 kDa (GBP28) (Nakano Y. *et al.*, *J. Biochem.* 120:803-812, 1996; Saito K. *et al.*, *Gene* 229:67-73, 1999; Saito K. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 22:1158-1162, 1999)), se adhiere a las paredes vasculares dañadas *in vitro*, bloquea la transmisión de señales de NF- $\kappa$ B endodérmico (Ouchi N. *et al.*, *Circulation* 102:1296-1301, 2000) e inhibe la proliferación celular de los músculos lisos inducida por HB-EGF y PDGF (Matsuzawa Y. *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 892:146-154, 1999). En el caso de los pacientes con obesidad, se ha informado de niveles séricos bajos de esta proteína (Arita Y. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:79-83, 1999). En el caso de los pacientes con diabetes de tipo II y de los que presentan enfermedades arteriales coronarias, se ha informado de que los niveles séricos mencionados anteriormente son reducidos (Hotta K. *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1595-1599, 2000).

En el pasado, factores tales como la glucosa en sangre, HbA<sub>1c</sub>, la insulina sérica, HOMA-IR, y similares se han conocido como factores asociados a la diabetes de tipo II. Sin embargo, estos factores eran insuficientes en términos de operabilidad y/o sensibilidad como indicadores para el diagnóstico de la diabetes de tipo II o para el control de efectos terapéuticos. Tal como se ha indicado anteriormente, también se ha sugerido la asociación de GBP28 con la diabetes de tipo II. Sin embargo, no se clarificó suficientemente si GBP28 era realmente aplicable al diagnóstico de la diabetes de tipo II y al control de los efectos terapéuticos en el campo clínico.

La técnica ELISA de Ohmoto *et al.* es conocida como procedimiento para el ensayo de GBP28 (Ohmoto *et al.*, *BIO Clinica* 15(10):758-761, 2000; publicación de patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2000-304748). La GBP28 natural en la sangre está constituida por 3 monómeros, y se agregan 4 a 6 trímeros (J. *Biochem.* 120:803-812, 1996). Sin embargo, el procedimiento de la técnica convencional mencionada anteriormente se complica debido a la utilización de un anticuerpo monoclonal para que GBP28 presente una estructura monomérica. Esto requirió la desnaturalización de la GBP28 natural en la muestra, la mezcla del espécimen con una solución de SDS en el momento del ensayo y la realización del tratamiento térmico a 100°C. Esta técnica convencional consistía en someter a ensayo la GBP28 natural en un estado desnaturalizado. Por lo tanto, no podía someter a ensayo directamente la GBP28 en su estado natural.

55 **Sumario de la invención**

Con el fin de superar los problemas indicados anteriormente, se sometieron a ensayo las concentraciones sanguíneas de una diversidad de parámetros asociados a la diabetes de tipo II en los pacientes con esta enfermedad. También se llevaron a cabo estudios concentrados con el fin de descubrir factores que pudiesen ser indicadores clínicos para el diagnóstico de trastornos del metabolismo de los carbohidratos tales como la diabetes de tipo II y el control de los efectos terapéuticos de agentes para la diabetes de tipo II. Como resultado, se descubrió que el ensayo de la GBP28 natural resultaba muy efectivo para el diagnóstico de los trastornos del metabolismo de los carbohidratos y para el control de los efectos terapéuticos de los agentes para ello, tal como se describe en los ejemplos, a continuación. También encontraron que GBP28 en una muestra podía someterse a ensayo simple y rápidamente en su estado natural mediante el ensayo de GBP28 en una forma agregada. Esto condujo a completar la presente invención.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo expuesto a continuación, (1) a (9).

- 5 (1) Un procedimiento para el diagnóstico de la diabetes de tipo II, que comprende medir un nivel de adiponectina natural (GBP28) que presenta una estructura de trímeros agregados de GBP28 constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28 en su estado natural en una muestra.
- 10 (2) Un procedimiento para el control de los efectos terapéuticos de agentes terapéuticos para la diabetes de tipo II, que comprende medir un nivel de adiponectina natural (GBP28) que presenta una estructura de trímeros agregados de GBP28 constituida por entre 4 y 6 trímeros de GBP28 en su estado natural en una muestra.
- (3) El procedimiento según (2), anteriormente, en el que los agentes para la diabetes de tipo II son derivados tiazolidina.
- 15 (4) Un procedimiento para proporcionar un indicador de resistencia a la insulina, que comprende medir un nivel de GBP28 natural que presenta una estructura de trímeros agregados de GBP28 constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28 en su estado natural en una muestra.
- 20 (5) El procedimiento según (4), anteriormente, en el que el indicador de resistencia a la insulina es un indicador de la resistencia a la insulina para individuos sanos.
- 25 (6) El procedimiento según cualquiera de entre (1) y (5), anteriormente, en el que la medición se lleva a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que no reaccione con una estructura monomérica de GBP28, pero que reaccione específicamente con GBP28 natural que presenta una estructura de trímeros agregados de GBP28 constituida por entre 4 y 6 trímeros de GBP28 en su estado natural.
- (7) Un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que no reaccione con una estructura monomérica de GBP28 pero que reaccione específicamente con GBP28 natural que presenta una estructura de trímeros agregados de GBP28 constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28.
- 30 (8) El anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según (7), anteriormente, producido a partir del hibridoma FERM BP-7660 o FERM BP-7661.
- 35 (9) Un kit o reactivo para medir el nivel de GBP28 natural en una muestra, que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según (7) u (8), anteriormente.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa esquemáticamente los principios del procedimiento según la presente invención y los de las técnicas convencionales.

La figura 2 representa los cambios de los niveles de adiponectina sérica causados por la administración durante tres meses de pioglitazona (30 mg/día) en 10 pacientes que presentan diabetes de tipo II (japoneses varones), en la que "O-O" representa la terapia de dieta y la administración de pioglitazona (n=7) y "■-■" representa la terapia de dieta y la administración de sulfonilurea y pioglitazona (n=3).

La figura 3 representa la curva de calibración para GBP28.

La figura 4 representa la linealidad de dilución para el ensayo de GBP.

#### Mejores modos de poner en práctica la invención

La GBP28 en el ser humano es conocido que presenta la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID n° 1 y la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n° 2. Es conocido que GBP28 en la sangre forma 4 a 6 trímeros agregados, estando constituida cada una por 3 monómeros (J. Biochem. 120:803-812, 1996).

Se ha descubierto que la concentración de GBP28 natural en una muestra tal como sangre obtenida de un sujeto sano muestra una correlación con los niveles de insulina asociados a un indicador de resistencia a la insulina, el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), triglicéridos, colesterol-HDL y colesterol-LDL, que son característicos de la diabetes de tipo II. También han encontrado que la concentración de GBP28 natural en una muestra tal como sangre obtenida de un paciente con diabetes de tipo II mostraba cambios más significativos que los niveles de glucosa plasmática, HbA<sub>1c</sub>, insulina sérica y HOMA-IR, que han sido utilizados como indicadores de la diabetes de tipo II en el control de los efectos terapéuticos de los agentes para la diabetes de tipo II utilizados para la misma. Basándose en estos resultados, se descubrió que la concentración de GBP28 natural en una muestra tal como sangre resultaba muy efectiva como nuevo indicador para el diagnóstico de los trastornos del metabolismo de los carbohidratos, tales como la diabetes de tipo II, y para el control de los efectos terapéuticos de agentes para la diabetes de tipo II.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, son proporcionados un procedimiento para diagnosticar la diabetes de tipo II y un procedimiento para el control de los efectos terapéuticos de los agentes para la diabetes de tipo II mediante el ensayo de la GBP28 natural en una muestra. En la presente memoria, "GBP28 natural" se refiere a la estructura agregada constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28.

En la presente invención, los ejemplos de la "muestra" comprenden de manera no limitativa, suero, plasma, líquido sinovial, efusión pleural, extracto de tejido, tejido, sobrenadante de cultivo y orina.

La presente invención resulta particularmente adecuada para el diagnóstico de la diabetes de tipo II o para el control de los efectos terapéuticos de los agentes.

Entre los ejemplos de agentes terapéuticos de la diabetes de tipo II están comprendidos los agentes sulfonilurea tales como glibenclamida, gliclazida, tolbutamida y glimepirida; agentes de liberación inmediata para acelerar la secreción de la insulina, tales como nateglínido; inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa tales como voglibosa y acarbosa; agentes para mejorar la resistencia a la insulina tales como pioglitazona, y biguanidas tales como la metformina. Estos agentes pueden utilizarse convenientemente en el procedimiento según la presente invención. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos particularmente preferidos para la diabetes de tipo II están comprendidos los derivados tiazolidina tales como la pioglitazina y la troglitazona.

Los procedimientos para el ensayo de la GBP28 natural no se encuentran particularmente limitados. El ensayo puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento convencional de la técnica, tal como el procedimiento de fase sólida, un ensayo competitivo, un ensayo de aglutinación, un ensayo turbidimétrico o un inmunoensayo enzimático tipo sándwich utilizando un anticuerpo monoclonal que reaccione específicamente con GBP28 natural que presenta una estructura de trímeros agregados de GBP28. Resulta particularmente preferido llevar a cabo un ensayo utilizando un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) en fase sólida. El inmunoensayo enzimático es una técnica común a la materia, y un experto en la materia podrá llevarla a cabo utilizando un anticuerpo que reaccione específicamente con la GBP28 indicada anteriormente.

Al utilizar un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con GBP28 natural en el ensayo indicado anteriormente, puede excluirse del ensayo la GBP28 desnaturalizada o monomérica, que no existe en un estado natural. Más específicamente, particularmente se prepara y se utiliza preferentemente un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio que aparece en primer lugar en un trímero al adoptar la GBP28 una conformación de tipo colágeno.

La figura 1 representa esquemáticamente principios del procedimiento según la presente invención para el ensayo de GBP28 natural y los de las técnicas convencionales. En la técnica convencional, la GBP28 expresada por la *E. coli* recombinante génica como inmunógeno con el fin de obtener un anticuerpo monoclonal contra GBP28. Sin embargo, debido a que la GBP28 recombinante se encuentra presente en forma de cuerpo de inclusión en *E. coli*, la proteína debe ser procesada con, por ejemplo, hidrocloreuro de guanidina, urea o un agente reductor al someterla a purificación. De esta manera, la GBP28 desnaturalizada y monomérica es el único tipo que puede utilizarse como inmunógeno. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el anticuerpo monoclonal resultante reacciona únicamente con GBP28 desnaturalizada y monomérica. Al someter a ensayo la GBP28 natural en la muestra, por lo tanto, previamente debe desnaturalizarse formando GBP28 monomérica. En contraste, el procedimiento según la presente invención utiliza un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con GBP28 natural. De esta manera, el ensayo puede llevarse a cabo sin procesar la GBP28 natural en la sangre.

El anticuerpo monoclonal según la presente invención puede obtenerse mediante una técnica común en la materia utilizando, por ejemplo, GBP28 natural como antígeno. La GBP28 natural puede purificarse pasando, por ejemplo, una gran cantidad de plasma humano a través de una columna de gelatina-Cellulofine (J. Biochem. 120:803-812, 1996), utilizando sus propiedades de unión a gelatina. Por ejemplo, se inmuniza un animal con su GBP28 natural, y se recoge un bazo o nódulo linfático del animal inmunizado. Se permite la fusión de las células productoras de anticuerpos contenidas en el bazo o nódulo linfático con células de mieloma con ayuda de polietilenglicol o similar para preparar hibridomas. Se criba para un hibridoma de interés, se cultiva dicho hibridoma y puede prepararse un anticuerpo monoclonal a partir del sobrenadante de cultivo. Puede llevarse a cabo el cultivo *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se administra un hibridoma en un ratón o similar por vía intraperitoneal y obtener a continuación un anticuerpo de interés a partir de su ascites. Puede purificarse un anticuerpo monoclonal mediante, por ejemplo, fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico o cromatografía aniónica o purificación de afinidad utilizando proteína A o antígeno inmovilizado. El anticuerpo así preparado se utiliza para el ensayo de la GBP28 natural, y también puede aplicarse al tratamiento de anticuerpos o similar de enfermedades causadas por la expresión anormal de GBP28.

Un anticuerpo monoclonal anti-GBP28 que puede particularmente utilizarse preferentemente en la presente invención se caracteriza de la manera siguiente:

la línea celular de mieloma utilizada: P3U1,

el antígeno: una solución de GBP28 (aproximadamente 50 µg) aislada y purificada a partir de suero humano se somete a micelización con un adyuvante completo; lo resultante se administra a un ratón intraperitonealmente; dos semanas después, el ratón se somete a un refuerzo, se extirpa el bazo 3 días después y se recolectan las células B,

el número de clones en los que se prepara el anticuerpo monoclonal: 3 (1H, 5, 6 y 7),

el tipo de Ig: completamente el tipo IgGk, y

el epítipo: reconoce únicamente los trímeros de GBP28 que no se encontraban térmicamente desnaturalizados, y de acuerdo con ello, se considera que este sitio aparece por primera vez al adquirirse la conformación de tipo colágeno

Los hibridomas IH-6 e IH-7 productores de un anticuerpo monoclonal anti-GBP28 que pueden utilizarse convenientemente en la presente invención han sido depositados en el depósito de organismos de patente internacional del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) el 12 de julio de 2001, bajo los números de acceso FERM BP-7660 y FERM BP-7661, respectivamente.

Específicamente puede llevarse a cabo un procedimiento para el diagnóstico de la diabetes de tipo II mediante el ensayo de GBP28 natural en la muestra y un procedimiento para el control de los efectos terapéuticos de los agentes terapéuticos, por ejemplo del modo descrito posteriormente.

#### 1) Ensayo de la concentración de GBP28

Se diluyeron los sueros o similares recogidos de pacientes o similares, los sueros diluidos o similares se añadieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GBP28 y se dejó que la GBP28 en el suero se uniese al anticuerpo monoclonal de ratón anti-GBP28 en el pocillo. Tras lavar el pocillo, se añadió un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GBP28 marcado con enzima y se permitió a continuación que se uniese al anticuerpo monoclonal de ratón anti-GBP28 existente en el pocillo. Tras lavar adicionalmente el pocillo, se añadió solución de sustrato del enzima para que se desarrollase el color. Tras terminar el desarrollo del color, se sometió a ensayo la absorbancia. Previamente se sometió a ensayo la absorbancia de la solución estándar de GBP28 a un nivel de concentración conocido del mismo modo, se preparó la curva de calibración para la absorbancia respecto a la concentración de GBP28, y la absorbancia sometida a ensayo se convirtió en la concentración de GBP28 basándose en la curva de calibración. De esta manera puede someterse a ensayo la concentración de GBP28 natural en los sueros o similares recogidos de pacientes o de similares.

#### 2) Procedimiento para el diagnóstico o control de la diabetes de tipo II

A utilizar la GBP28 natural como indicador para el diagnóstico de la diabetes de tipo II, por ejemplo, se comparó la concentración de la GBP28 natural sometida a ensayo mediante el procedimiento indicado anteriormente, con el valor normal o el valor límite, que había sido calculado anteriormente.

#### 3) Procedimiento para el control del efecto terapéutico de un agente

Al utilizar una GBP28 natural a modo de indicador del control de los efectos terapéuticos de un agente terapéutico para la diabetes de tipo II, por ejemplo, se muestrea sangre de un paciente con diabetes de tipo II antes y después del inicio del tratamiento, se somete a ensayo la GBP28 natural mediante el procedimiento anterior, y se calcula la tasa de cambio del contenido de GBP28 en la sangre desde antes del inicio del tratamiento hasta después del inicio del tratamiento, evaluando de esta manera los efectos terapéuticos. En el caso de que la concentración sanguínea de GBP28 natural tras el inicio del tratamiento sea elevada en comparación con la anterior al tratamiento, pueden reconocerse los efectos terapéuticos de los agentes. El intervalo para el muestreo de sangre en este caso es preferentemente de entre 1 y 3 meses.

La presente invención proporciona además un kit para el ensayo de GBP28 natural en la muestra, que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que no reacciona con una estructura monomérica de GBP28, sino que reacciona específicamente con GBP28 natural. El kit según la presente invención puede comprender convenientemente, además del anticuerpo anteriormente mencionado según la presente invención, por ejemplo, un tampón un anticuerpo secundario marcado con un marcaje tal como peroxidasa, una solución estándar, una solución de bloqueo, una solución de sustrato enzimático tal como peroxidasa, y un líquido de lavado. El anticuerpo monoclonal según la presente invención reconoce la estructura de trímeros agregados de GBP28. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, puede llevarse a cabo un ensayo de tipo sándwich mediante la inmovilización de un anticuerpo monoclonal no marcado sobre la placa, añadiendo una muestra que contiene GBP28, y después utilizando un anticuerpo monoclonal marcado del mismo tipo.

## Ejemplos

Se describe a continuación la presente invención con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos no limitativos de la presente invención siguientes.

En los ejemplos siguientes, se llevaron a cabo todos los análisis estadísticos utilizando el programa StatView® para Macintosh (versión 4.5-J, Abacus Concepts Inc., Berkeley, California). Para la comparación entre la línea base y los datos del gráfico durante 3 meses, se llevó a cabo un ensayo de rangos con signo de Wilcoxon (de dos colas). Para la comparación entre la tasa de cambio de GBP28 y otros parámetros, se evaluó la significancia utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de correlación parcial. Los niveles séricos de insulina, TG y GBP28 y HOMA-IR presentarían una distribución normal tras la conversión logarítmica en un estudio a gran escala. De esta manera, se utilizaron valores logarítmicos para los análisis de estos parámetros. Todos los datos se representan por "media  $\pm$  S.D.". En el caso de que  $p$  sea inferior a 0,05, se determina que es estadísticamente significativo.

### [Ejemplo 1] Ensayo de cada parámetro

Se sometieron a inspección 10 pacientes varones que presentaban diabetes de tipo II (edades de entre 40 y 66,  $57,7 \pm 7,4$ ) bajo sólo terapia de dieta ( $n=7$ ) o bajo terapia de dieta y medicación con sulfonilurea ( $n=3$ ), con respecto a los parámetros siguientes antes y después de una administración de tres meses de un derivado de tiazolidina, la pioglitazona. Los pesos corporales, los niveles de glucosa en sangre y los niveles de presión sanguínea de los pacientes y sus tratamientos se mantuvieron constantes durante por lo menos 3 meses antes del examen. Las dosis de sulfonilurea para 3 pacientes se encontraban a niveles constantes durante dicho periodo. La pioglitazona se administró a la totalidad de los 10 pacientes tras el desayuno cada día (oralmente, 30 mg/día). Las edades, los índices de masa corporal (IMC) y los perfiles clínicos de los pacientes en el tiempo de inicio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Perfiles clínicos de pacientes con diabetes de tipo II

Parámetro	10	Intervalo
N	10	
Edad (años)	$57,4 \pm 7,4$	[ 40 - 66 ]
Altura (cm)	$164,2 \pm 5,2$	156,0 - 171,6]
Peso (kg)	$71,3 \pm 9,8$	[57,3 - 85,1]
Índice de masa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$26,4 \pm 3,2$	[22,4 - 32,5]
Duración de la enfermedad (años)	$7,0 \pm 4,5$	[2,0 - 15,0]
Glucosa (mmoles/l)	$8,6 \pm 1,4$	[6,9 - 11,3]
HbA <sub>1c</sub> (%)	$6,7 \pm 0,8$	[5,3 - 8,2 ]
Los datos son de $n$ o medias $\pm$ S.D.		

En la tabla, los datos son de  $n$  o medias ( $\pm$  S.D.).

La presión sanguínea sistólica (SBP) y la presión sanguínea diastólica (DBP) se midieron dos veces en posición sentada tras una pausa de por lo menos 5 minutos. Se midieron los pesos corporales, pesos y niveles de glucosa plasmática en ayuno (FPG), HbA<sub>1c</sub>, insulina sérica, adiponectina, colesterol total (TC), triglicéridos (TG), colesterol-HDL, colesterol-LDL y ácido úrico en la mañana tras ayunar durante la noche. Se midieron los niveles de glucosa plasmática, lípidos y ácido úrico utilizando una técnica de medición automática común. Se midió la concentración sérica de insulina utilizando un kit comercializado, EIA (Tosoh, Tokyo), tal como se ha descrito anteriormente (Kaway T. *et al.*, Metabolism 48:1102-1107, 1999; Hirose H. *et al.*, Clin. Sci. (Colch) 94:633-636, 1998; Hirose H. *et al.*, J. Hypertens. 16:2007-2012, 1998; Hirose H. *et al.*, Clin. Sci. (Colch) 100:145-150, 2001). El índice de resistencia a la insulina se evaluó mediante evaluación del modelo de homeostasis (HOMA-IR) (Matthews D.R. *et al.*, Diabetologia 28:412-419, 1985; Rudenski A.S. *et al.*, Metabolism 40:908-917, 1991).

Se muestran los resultados en la Tabla 2.

Tabla 2

Efectos de la administración durante tres meses de pioglitazona sobre cada parámetro

5

Parámetro	Línea base	Tras el periodo de tres meses	Tasa de cambio durante los 3 meses
N	10	10	
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	26,4 ± 3,2	27,0 ± 3,5	*
Índice de masa corporal con presión sanguínea sistólica (kg/m <sup>2</sup> )	149 ± 18	138 ± 15	**
Índice de masa corporal con presión sanguínea diastólica (kg/m <sup>2</sup> )	89 ± 13	83 ± 9	*

Tabla 2 (continuación)

Parámetro	Línea base	Tras el periodo de tres meses	Tasa de cambio durante los 3 meses
Glucosa sanguínea en ayuno (mmoles/l)	8,6 ± 1,4	7,0 ± 1,0	**
HbA <sub>1c</sub> (%)	6,7 ± 0,8	6,1 ± 0,6	*
Insulina sérica (pmoles/l) (log)	54 ± 11	30 ± 8	**
HOMA-IR (log)	3,4 ± 1,9	1,6 ± 1,3	*
Colesterol total (mg/dl)	208 ± 26	218 ± 35	
Triglicéridos (mg/dl) (log)	134 ± 2	127 ± 2	
Colesterol-HDL (mg/dl)	51,7 ± 9,4	52,1 ± 7,3	
Colesterol-LDL (mg/dl)	124 ± 24	138 ± 24	*
Ácido úrico (mg/dl)	5,9 ± 1,1	5,6 ± 1,3	
GBP28 (µg/l) (log)	4,8 ± 1,7	14,4 ± 2,1	**

Los datos son de n o medias ± S.D.

\*P&lt;0,05 (ensayo de Wilcoxon)

\*\*P&lt;0,01 (ensayo de Wilcoxon)

10 En la tabla, los datos son de n o medias (± S.D.).

15 Tal como se muestra en la Tabla 2, una administración de tres meses de pioglitazona resultó en niveles significativamente reducidos de presión sanguínea sistólica, presión sanguínea diastólica, glucosa plasmática en ayuno, HbA<sub>1c</sub>, insulina sérica y HOMA-IR. El índice de masa corporal (IMC) y el nivel de colesterol-LDL resultaban elevados, aunque no se produjo ningún cambio significativo de los niveles de triglicéridos, colesterol-HDL o ácido úrico.

20 Se observaron efectos de control de la glucosa sanguínea y de los niveles de presión sanguínea de manera similar al caso de la troglitazona (Kawai T. *et al.*, Metabolism 48:1102-1107, 1999), en contraste con el grupo de control, sometido a terapia de dieta. Respecto a los efectos de la tiazolidinediona sobre los niveles de presión sanguínea, se ha informado de que la troglitazona reduce los niveles de presión sanguínea en experimentos con animales resistentes a la insulina (Yoshioka S. *et al.*, J. Hypertens. 18:1857-1864, 2000) y en un estudio clínico (Ogihara T. *et al.*, Am. J. Hypertens 8:316-320, 1995). Respecto a los efectos sobre el colesterol-LDL, la administración de troglitazona (Schwartz S. *et al.*, N. Engl. J. Med. 338:861-866, 1998) o rosiglitazona (Balfour J.A. y Plosker G.L., Drugs 57:921-930, 1999), se ha informado de que se asocia a la elevación del nivel de colesterol-LDL. El nivel del colesterol-LDL se incrementó ligeramente al administrar pioglitazona. El efecto era más significativo tras 3 meses.

### [Ejemplo 2] Evaluación de la distribución de la grasa corporal

30 Los pacientes que también habían sido utilizados en el ejemplo 1 se sometieron a la evaluación de la distribución de la grasa corporal antes y después de la administración durante tres meses de pioglitazona. Se determinaron las distribuciones de la grasa subcutánea y visceral mediante la evaluación de la región de una unidad de Hounsfield de entre -150 y -50 mediante un procedimiento modificado a partir del escaneo de tomografía computerizada (CT) al nivel del ombligo por Tokunaga *et al.* (Tokunaga K. *et al.*, Int. J. Obes. 7:437-445, 1983). Las imágenes de CT en la línea base y tras un tratamiento de tres meses se obtuvieron utilizando los mismos protocolos de los que se ha informado anteriormente (Kawai T. *et al.*, Metabolism 48:1102-1107, 1999). Se calculó la proporción V/S mediante la división del área de grasa visceral (VFA) por el área de grasa subcutánea (SFA). Se muestran los resultados en la Tabla 3.

Tabla 3

Efecto de la administración durante tres meses de pioglitazona sobre la distribución de la grasa corporal

Parámetro	Línea base	Tras el periodo de tres meses	Tasa de cambio durante los 3 meses
N	10	10	
Área de grasa visceral (cm <sup>2</sup> )	165 ± 38	180 ± 46	
Área de grasa subcutánea (cm <sup>2</sup> )	155 ± 69	179 ± 81	*
Proporción V/S	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,3	
Los datos son de n o medias ± S.D. *P<0,05 (ensayo de Wilcoxon)			

5

En la tabla, los datos son de n o medias (± S.D.).

Tal como se muestra en la Tabla 3, el IMC y el área de grasa subcutánea (SFA) se incrementaron significativamente tras la administración durante tres meses de pioglitazona. Este resultado fue sustancialmente el mismo que el obtenido mediante la administración de troglitazona (Kaway T. *et al.*, Metabolism 48:1102-1107, 1999; Kelly I.E. *et al.*, Diabetes Care 22:288-293, 1999; Mori Y. *et al.*, Diabetes Care 22:908-912, 1999). Por el contrario no se redujo el área de grasa visceral (VFA) sino que por el contrario se incrementó ligeramente. Esto es diferente de los resultados obtenidos basándose en la administración de troglitazona. Aunque el motivo de dicha diferencia todavía no se ha esclarecido, podría deberse a diferencias estructurales tales como la estructura de vitamina E de la troglitazona y/o las funciones de PPAR $\alpha$ . El VFA tendía a ser mayor, mientras que la proporción V/S tendía a ser menor. Sin embargo, estas diferencias no eran estadísticamente significativas.

### [Ejemplo 3] Ensayo de GBP28

Los pacientes utilizados en el Ejemplo 1 se sometieron además a un ensayo de la concentración sanguínea de GBP28 natural antes y después de la administración durante tres meses de pioglitazona.

Se preparó el anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humano de la manera siguiente. En primer lugar, se sometió a micelización con un adyuvante completo una solución de GBP28 (aproximadamente 50  $\mu$ g) aislada y purificada a partir de suero humano y lo resultante se administró en un ratón por vía intraperitoneal. Dos semanas después, el ratón se sometió a un refuerzo, se extirpó el bazo 3 días después y se recogieron las células B. Se permitió que se fusionasen entre sí las células B y las células de mieloma para preparar hibridomas, y se administró un hibridoma de interés en un ratón por vía intraperitoneal. A continuación (20 días después), se procesó la ascites mediante cromatografía DEAE-sefarosa Fast Flow, obteniéndose el anticuerpo monoclonal de interés.

Se sometió a ensayo la GBP28 mediante ELISA de la manera siguiente. Se añadió una muestra estándar de GBP28, una muestra desconocida diluida 441 veces y una muestra de control (100  $\mu$ l cada una) a una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GBP28. La placa se incubó durante 60 minutos, el pocillo se lavó, y se realizó la incubación durante 30 minutos adicionales con anticuerpo monoclonal anti-GBP28 de ratón marcado con peroxidasa de rábano. Se lavó nuevamente la placa y se llevó a cabo la incubación durante 30 minutos con un reactivo de tetrametilbencidina. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de solución acuosa de ácido sulfúrico 0,36 N a cada pocillo para terminar la reacción y se sometió a ensayo la absorbancia a 450 nm. Los coeficientes intraensayo e interensayo fueron de 4,8% a 4,9% y de 3,3% a 6,8%, respectivamente.

Como resultado de la administración durante tres meses de pioglitazona, se observó la elevación del nivel sérico de adiponectina en la totalidad de los 10 pacientes (1,5 a 6,8 veces superior a las líneas de base y 3 veces superior a la media) (Tabla 2 y figura 2). Además, se examinó la tasa de cambio de GBP28 y de otros parámetros representados en las Tablas 2 y 3 generados durante el curso de tres meses. Se compararon entre sí las tasas de cambio de los valores medidos de cada parámetro (algunos eran valores logarítmicos). Como resultado se descubrió que la concentración de GBP28 en la muestra mostraba una tasa de cambio mayor (80,9%) que los niveles de glucosa sanguínea (18,2%), HbA<sub>1c</sub> (9,0%), insulina sérica (23,7%), HOMA-IR (62,6%) y similares que se han conocido convencionalmente como factores asociados a la diabetes de tipo II.

### [Ejemplo 4] Resultados de ensayo en sujetos sanos

En el Ejemplo 3, se descubrió que la GBP28 era aplicable al control de los efectos terapéuticos de los derivados de tiazolidina, es decir, los agentes terapéuticos para la diabetes de tipo II, en pacientes con diabetes de tipo II. Además, pudo predecirse la aplicabilidad de la concentración de GBP28 como indicador de la resistencia a la insulina. De esta manera, se sometieron individuos sanos a inspección para la asociación entre la concentración sanguínea de GBP28 y parámetros que se ha informado que se asocian a la resistencia a la insulina.



Se sometieron a inspecciones para los parámetros de los que se ha informado se encuentran asociados a la resistencia a la insulina 980 individuos de edades comprendidas entre 30 y 65 años que acuden anualmente al hospital para revisiones médicas. Específicamente, los sujetos eran 714 varones y 266 mujeres, y los pacientes que presentaban enfermedades endocrinas o enfermedades renales o hepáticas graves se excluyeron del estudio. Además, los pacientes que habían recibido insulina, agentes antidiabéticos o agentes antihiperlipidémicos como medicación fueron excluidos.

5  
10  
15

Se midieron los parámetros, es decir la presión sanguínea sistólica (SBP) y la presión sanguínea diastólica (DBP) dos veces en una posición de sentado tras un intervalo de por lo menos 5 minutos. Se midieron edades, IMC, tasas cardiacas, niveles de glucosa plasmática en ayuno (FPG), insulina sérica, adiponectina, colesterol total (TC), triglicéridos (TG), colesterol-HDL, colesterol-LDL y ácido úrico en la mañana posterior al ayuno de la noche. Se midieron los niveles de glucosa y ácido úrico plasmáticos mediante una técnica de medición automática común. Se midió la concentración sérica de insulina utilizando un kit disponible comercialmente, EIA (Tosoh, Tokyo), tal como se ha descrito anteriormente. Se evaluó el índice de resistencia a la insulina mediante evaluación del modelo de homeostasis (HOMA-IR).

Los resultados de la comparación entre cada parámetro medido en dichas inspecciones y GBP28 referidos a sujetos varones se muestran en la Tabla 4, y los referentes a sujetos mujeres se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4

vs. log [GBP28]	A			B			C			D		
	Media ± S.D.	r	P	Media ± S.D.	r	P	Corrección del índice de masa corporal	r	P	Corrección del índice de masa corporal	r	P
Edad	(años)	46,4 ± 10,1	0,044	NS	-	-	-	-	-	-	-	-
Índice de masa corporal	(kg/m <sup>2</sup> )	23,2 ± 2,7	-0,354	<0,0001	-	-	-	-	-	-	-	0,0069
Grasa corporal	(%)	21,8 ± 4,8	-0,369	<0,0001	-0,177	0,065	-	-	-	-	-	-
Presión sanguínea sistólica	(mm Hg)	124 ± 18	-0,164	<0,0001	-0,052	NS	-0,100	NS	NS	-0,100	NS	NS
Presión sanguínea diastólica	(mm Hg)	77 ± 12	-0,140	0,0002	-0,047	NS	-0,064	NS	NS	-0,064	NS	NS
Tasa cardíaca	(latidos/minuto)	75 ± 13	-0,043	NS	-0,033	NS	-0,012	NS	NS	-0,012	NS	NS
Glucosa	(mg/dl)	95 ± 16	-0,140	0,0002	-0,067	0,068	-0,057	NS	NS	-0,057	NS	NS
Insulina (log)	(µU/ml)	5,58 ± 3,60	-0,338	<0,0001	-0,229	<0,0001	-0,362	<0,0001	<0,0001	-0,362	<0,0001	<0,0001
HOMA-IR (log)	(-)	1,33 ± 0,98	-0,348	<0,0001	-0,237	<0,0001	-0,362	<0,0001	<0,0001	-0,362	<0,0001	<0,0001
Colesterol total	(mg/dl)	200 ± 31	-0,065	0,08	-0,013	NS	0,018	NS	NS	0,018	NS	NS
Triglicéridos (log)	(mg/dl)	121 ± 84	-0,344	<0,0001	-0,197	<0,0001	-0,207	<0,0001	<0,0001	-0,207	<0,0001	0,0005
Colesterol-HDL	(mg/dl)	54 ± 13	0,414	<0,0001	-0,330	0,0001	0,293	0,0001	0,0001	0,293	<0,0001	<0,0001
Colesterol-LDL	(mg/dl)	126 ± 28	-0,154	<0,0001	-0,083	0,024	-0,030	0,024	0,024	-0,030	NS	NS
Ácido úrico	(mg/dl)	6,2 ± 1,2	-0,258	<0,0001	-0,174	<0,0001	-0,214	<0,0001	<0,0001	-0,214	<0,0001	0,0003

Los datos son medias ± S.D. NS: P>0,1, n=330 (respecto a la grasa corporal)

Tabla 5

vs. log [GBP28]	A			B			C			D		
	Media ± S.D.	r	P	Media ± S.D.	r	P	Corrección dependiente de la edad y del índice de masa corporal	r	P	Corrección dependiente de la edad y del índice de masa corporal	r	P
Edad (años)	41,7 ± 9,9	0,089	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	20,7 ± 2,7	0,226	0,0002	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grasa corporal (%)	21,8 ± 4,8	-0,360	<0,0001	-0,566	0,0073	0,0073	0,0073	0,0073	0,0073	0,0073	0,0073	0,0073
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	112 ± 16	-0,037	NS	0,050	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Presión sanguínea diastólica (mm Hg)	68 ± 11	-0,043	NS	0,016	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tasa cardiaca (latidos/minuto)	74 ± 10	0,029	NS	0,072	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glucosa (mg/dl)	90 ± 9	-0,128	0,037	-0,036	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Insulina (log) (µU/ml)	4,82 ± 2,50	-0,220	0,0003	-0,137	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
HOMA-IR (log) (-)	1,08 ± 0,61	-0,225	0,0002	-0,134	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
Colesterol total (mg/dl)	193 ± 33	0,010	NS	0,006	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Triglicéridos (log) (mg/dl)	68 ± 37	-0,306	<0,0001	-0,275	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Colesterol-HDL (mg/dl)	69 ± 15	0,393	<0,0001	0,345	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Colesterol-LDL (mg/dl)	112 ± 28	-0,175	0,0042	-0,199	0,0041	0,0041	0,0041	0,0041	0,0041	0,0041	0,0041	0,0041
Ácido úrico (mg/dl)	4,3 ± 0,94	-0,018	NS	-0,025	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Los datos son medias ± S.D. NS: P>0,1, n=330 (respecto a la grasa corporal)

En estas tablas, los datos son de "medias  $\pm$  S.D.", coeficientes de correlación y valores de p. La GBP28 sanguínea mostraba un amplio intervalo de distribuciones de la concentración entre 0,4  $\mu\text{g/ml}$  y 61,2  $\mu\text{g/ml}$ . Las concentraciones sanguíneas de GBP28 de los sujetos varones eran de  $7,2 \pm 4,6 \mu\text{g/ml}$ , y las de los sujetos mujeres, de  $13,3 \pm 7,3 \mu\text{g/ml}$ . Es decir, los sujetos mujeres mostraron una concentración superior de GBP28 que los sujetos varones.

Tal como se muestra en las Tablas 4 y 5, la concentración sanguínea de GBP28 mostraba correlaciones negativas con IMC, la presión sanguínea sistólica, la presión sanguínea diastólica, la glucosa plasmática en ayuno, la insulina, HOMA-IR, los triglicéridos, el colesterol-LDL y el ácido úrico. La concentración sanguínea de GBP28 mostraba correlaciones positivas con el colesterol-HDL. Al realizar las correcciones dependientes de la edad y el IMC y comparar GBP28 y cada parámetro, se alcanzaron correlaciones estadísticamente significativas con una fiabilidad de  $p < 0,05$ , con respecto a la insulina (varones:  $r = -0,229$ , mujeres:  $r = -0,137$ ), HOMA-IR (varones:  $r = -0,237$ , mujeres:  $r = -0,134$ ), triglicéridos (varones:  $r = -0,197$ , mujeres:  $r = -0,275$ ), colesterol-HDL (varones:  $r = -0,330$ , mujeres:  $r = 0,345$ ) y colesterol-LDL (varones:  $r = -0,083$ , mujeres:  $r = -0,199$ ). Por lo tanto, la concentración sanguínea de GBP28 mostraba correlaciones con HOMA-IR, insulina, triglicéridos, colesterol-HDL y colesterol-LDL.

Como resultado, se descubrió que la concentración de GBP también podía resultar un indicador de la resistencia a la insulina para individuos sanos.

**[Ejemplo 5] Producción de un kit para someter a ensayo la GBP28 natural en una muestra**

A. Materiales para el kit según la presente invención:

(1) Una placa recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humano

- Una solución de anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humano.

El anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humano obtenido mediante el procesamiento de ascites de ratón mediante cromatografía de DEAE-sefarosa Fast Flow se ajustó a 10  $\mu\text{g/ml}$  con ayuda de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0).

- Composición del líquido de lavado para la preparación de una placa.

Tabla 6

Reactivo	Concentración
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	60 mM
Tween 20	0,05%
pH 7,0	-

- Composición de la solución de bloqueo

Tabla 7

Reactivo	Concentración
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	60 mM
BSA	1,0%
pH 7,0	-

1. Fraccionamiento de una solución de anticuerpo a razón de 120  $\mu\text{l/pocillo}$  en la placa MaxiSorp F8 (Nunc) y después reposo de la placa a 4°C durante la noche.

2. Eliminación de la solución de anticuerpo y después lavado de la placa dos veces con un líquido de lavado.

3. Fraccionamiento de una solución de bloqueo a razón de 200  $\mu\text{l/pocillo}$  y después reposo de la placa a 37°C durante la noche.

4. Eliminación de la solución de bloqueo.

5. Reposo de la placa bajo presión reducida durante la noche, secado exhaustivo, sellado hermético y almacenamiento a continuación a 4°C.

(2) Solución estándar

- Solución de antígeno GBP28

5 Se purificó GBP28 a partir del suero agrupado de individuos sanos utilizando una columna de afinidad a la que se había unido el anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humano. A continuación, se llevó a cabo adicionalmente la filtración en gel. Se determinó la concentración de GBP28 basándose en la absorbancia a 280 nm (se determinó que la concentración a una Abs.280 nm=1,000 era de 1,0 mg/ml).

- Tampón de dilución

10 Tabla 8

Reactivo	Concentración
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	16 mM
BSA	1,0%
pH 7,4	-

15 Se diluyó la solución de GBP28 con ayuda del tampón de dilución que presentaba la composición anteriormente indicada. De esta manera, se fijó la concentración de GBP28 en 0, 2, 5, 10, 25 y 50 ng/ml.

(3) Solución de anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humana marcado con peroxidasa

- Solución madre de anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humana marcado con peroxidasa

20 Se sometió el anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humana a digestión con pepsina y tratamiento reductor para preparar el fragmento Fab' y se permitió que peroxidasa activada con maleimida se uniese al mismo. Se calculó la concentración mediante la determinación de cada concentración de anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humana en el sitio Fab' y en el sitio de la peroxidasa basándose en la absorbancia a 280 nm y a 403 nm y después sumándolas.

25 - Solución para la dilución de anticuerpo marcado

Tabla 9

Reactivo	Concentración
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	16 mM
BSA	1,0%
pH 6,5	-

30 Se diluyó la solución de anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humana marcado con peroxidasa, con ayuda de una solución para diluir un anticuerpo marcado, que presentaba la composición mencionada anteriormente, y se fijó la concentración del anticuerpo marcado en 350 ng/ml. De esta manera se preparó una solución de anticuerpo monoclonal anti-GBP28 humana marcado con peroxidasa.

35 (4) Líquido de lavado concentrado (diluido 20 veces con agua purificada en el momento de la utilización)

Tabla 10

Reactivo	Concentración
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	40 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	60 mM
Tween 20	1,0%
pH 6,5	-

40 (5) Solución de sustrato

Se utilizó una solución de tetrametilbenzidina (TMB) comercializada para la ELISA.

(6) Terminador de reacción

45 Se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36 N.

B. Protocolo de ensayo

50 Se diluyeron los especímenes que debían someterse a ensayo hasta las concentraciones adecuadas (hasta

50 ng/ml) con ayuda del tampón de dilución que se utilizó para la preparación de la solución estándar. La proporción de dilución de los especímenes generales puede ser convenientemente aproximadamente 400 a 500 veces (por ejemplo la dilución de 21 veces se realiza dos veces para alcanzar una dilución de 441 veces).

- 5 1. Introducción de una solución estándar y un espécimen que debe someterse a ensayo en los pocillos de una placa (100 µl/pocillo).
2. Agitación durante aproximadamente 5 a 10 segundos con un agitador de placas y después reposo de la placa a temperatura ambiente resguardado de la luz durante 60 minutos.
- 10 3. Eliminación de la solución estándar y del espécimen y lavado de la placa cuatro veces con un líquido de lavado.
4. Introducción de una solución de anticuerpo marcado con peroxidasa en los pocillos de una placa (100 µl/pocillo).
- 15 5. Agitación durante aproximadamente 5 a 10 segundos utilizando un agitador de placas y después reposo de la placa a temperatura ambiente resguardado de la luz durante 30 minutos.
6. Eliminación de la solución de anticuerpo marcado con peroxidasa y lavado de la placa cuatro veces con un líquido de lavado.
- 20 7. Introducción de una solución de sustrato en los pocillos de una placa (100 µl/pocillo).
8. Agitación durante aproximadamente 5 a 10 segundos utilizando un agitador de placas y después reposo a temperatura ambiente resguardado de la luz durante 30 minutos.
- 25 9. Introducción de un terminador de reacción en los pocillos de una placa (100 µl/pocillo).
10. Agitación durante aproximadamente 5 a 10 segundos utilizando un agitador de placas y ensayo de la absorbancia de cada pocillo (longitud de onda de ensayo: 450/650 nm (primaria/secundaria), expresión aproximada para la curva de calibración: cuadrática).
- 30

**[Ejemplo 6] Preparación de la curva de calibración**

35 Las soluciones estándares preparadas de 0, 2, 5, 10, 25 y 50 ng/ml de GBP28 se sometieron a ensayo como muestras y se inspeccionó la curva de calibración. Tal como se muestra en la figura 3, la curva de calibración obtenida era sustancialmente lineal. Debido a que la concentración media de GBP28 en la sangre era de 10 µg/ml, se sometió el espécimen a una dilución de 21 veces en dos ocasiones para alcanzar una dilución de 441 veces. El ensayo se llevó a cabo a esta concentración (intervalo del ensayo: 0 a 22 µg/ml).

**[Ejemplo 7] Ensayo de repetibilidad**

45 Con el fin de evaluar los cambios en los valores de ensayo obtenidos con el kit, se utilizaron 3 tipos de muestras de suero, y cada una de ellas se sometió a ensayo 24 veces. Como resultado, los valores de CV fueron satisfactoriamente del 5% o inferiores, tal como se muestra en la figura 11. De esta manera, pudo determinarse que los valores de ensayo obtenidos con el kit de la presente invención eran fiables.

Tabla 11  
Repetibilidad del ensayo de GBP28

50

	GBP28 (µg/ml)		
	A	B	C
1	4,95	8,25	15,26
2	5,93	8,59	13,61
3	5,82	6,64	14,82
4	5,63	8,11	12,99
5	5,86	7,93	14,59
6	5,96	7,67	13,34
7	5,55	7,50	14,56
8	5,46	7,78	13,53
9	5,55	7,47	14,70
10	5,62	7,92	13,48
11	5,17	7,97	13,59
12	5,80	7,48	15,00
13	5,94	8,15	14,29
14	5,39	7,99	15,04

Tabla 11 (continuación)

	GBP28 (µg/ml)		
	A	B	C
15	5,84	7,78	14,22
16	5,46	7,82	14,22
17	5,53	8,09	14,59
18	5,85	7,68	14,01
19	6,01	7,75	14,32
20	5,88	8,18	14,88
21	5,63	7,83	13,13
22	5,80	8,28	15,15
23	6,21	8,41	15,33
24	5,82	8,08	14,80
N	24	24	24
MAX.	6,21	8,59	15,33
MIN.	4,95	6,64	12,99
MEDIA	5,694	7,889	14,309
S.D.	0,2762	0,3834	0,6883
C.V.	4,8%	4,9%	4,8%

#### 5 [Ejemplo 8] Ensayo de repetibilidad día a día

Con el fin de evaluar las variaciones diarias generadas en los valores de ensayo obtenidos con el kit, se utilizaron 5 tipos de muestras de suero, y cada una de ellas se sometió al ensayo 5 veces en cinco días separados. Como resultado, las variaciones de los valores de ensayo durante 5 días presentaron satisfactoriamente un c.v. de 3,3% a 6,8%, tal como se muestra en la Tabla 12. De esta manera, pudo determinarse que los valores de ensayo obtenidos con el kit de la presente invención eran fiables.

Tabla 12

Repetibilidad día a día del ensayo de GBP28

	GBP28 (µg/ml)				
	A	B	C	D	E
1	7,67	5,88	5,38	15,98	11,91
2	8,24	5,61	5,37	16,19	12,12
3	8,08	5,85	6,00	14,58	11,49
4	8,44	6,00	5,72	15,88	11,86
5	7,26	5,32	4,89	14,93	11,04
N	5	5	5	5	5
MAX.	8,44	6,00	6,00	16,19	12,12
MIN.	7,26	5,32	4,89	14,58	11,04
MEDIA	7,937	5,730	5,471	15,514	11,684
S.D.	0,4220	0,2432	0,3736	0,6366	0,3835
C.V.	5,3%	4,2%	6,8%	4,1%	3,3%

#### [Ejemplo 9] Ensayo de dilución

Con el fin de evitar la influencia del componente sérico sobre el sistema de reacción, la muestra de suero se diluye habitualmente y se utiliza a continuación para un ensayo al utilizar el kit de agente diagnóstico. Para confirmar que la proporción de dilución era óptima, una muestra a una concentración dada se diluye convenientemente y después se somete a ensayo, y se determina si los valores obtenidos resultan o no en una línea recta en el gráfico. Una línea recta indica que las propiedades de la muestra son equivalentes a las de la solución estándar. Se determinó que los valores de ensayo no resultaban afectados por el componente sérico.

Se diluyeron tres tipos de muestras de suero 441 veces de acuerdo con el protocolo de ensayo; estas muestras se diluyeron adicionalmente a razón de entre 1/5 y 5/5, y cada una de ellas se sometió al ensayo por duplicado. Como resultado, todos los especímenes mostraron una buena linealidad, tal como se muestra en la Tabla 13 y en la figura 4. Esto indica que la proporción de dilución del kit era apropiada.

Tabla 13

Linealidad de dilución del ensayo de GBP28

5

Suero 1

Dilución (/5)	Concentración de GBP28 (µg/ml)	Concentración de GBP28 (µg/ml)	Concentración de GBP28 (µg/ml)
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
1	1,54	1,00	2,88
1	1,59	1,05	3,00
2	2,73	2,28	6,41
2	2,99	2,03	6,05
3	4,36	3,24	9,63
3	4,08	3,21	8,75
4	6,43	4,60	12,34
4	5,88	4,25	11,28
5	7,45	5,20	15,04
5	7,68	5,32	13,88

**[Ejemplo 10] Ensayo de adición-recuperación**

10 Al contrario que las proteínas aisladas, las proteínas que se encuentran presentes en la sangre pueden formar un complejo con diversas otras proteínas o sustancias existentes en la sangre, o experimentar cambios en sus conformaciones. Aunque se obtuvieron buenos resultados de la evaluación de una muestra estándar preparada a partir de una proteína aislada a una concentración adecuada, no pudo obtenerse en todos los casos una concentración exacta al utilizar suero o similar como muestra (por ejemplo, la formación de complejo resulta en la pérdida de un epítipo del anticuerpo).

15

De esta manera, se prepararon las muestras mediante la adición a suero de muestra de una solución estándar de GBP28 ajustada a una concentración adecuada, y las muestras resultantes se sometieron al ensayo. A continuación, se restó del valor obtenido el nivel de concentración de la muestra antes de la adición de la muestra estándar, y el resultado se dividió por la cantidad añadida, determinándose de esta manera la tasa de recuperación. Como resultado, se obtuvo una buena tasa de recuperación, de aproximadamente 95% de media, tal como se muestra en la Tabla 14. De esta manera se demostró que este kit podía ser utilizado para llevar a cabo el ensayo sin influencia del componente sanguíneo sobre la muestra estándar añadida. Lo expuesto anteriormente también verificó que la concentración sanguínea de GBP28 podía analizarse con exactitud.

20

25

Tabla 14

Resultados del ensayo de adición-recuperación				
Suero 1				
	Ninguno	A	B	C
Media (µg/ml)	10,34	11,85	13,98	19,90
Cantidad añadida (µg/ml)	-	1,52	3,65	9,57
Tasa de recuperación (%)	-	93,4	95,6	91,9
Suero 2				
	Ninguno	A	B	C
Media (µg/ml)	13,73	1,52	17,75	23,16
Cantidad añadida (µg/ml)	-	1,52	4,02	9,43
Tasa de recuperación (%)	-	93,8	105,3	90,6
Suero 3				
	Ninguno	A	B	C
Media (µg/ml)	26,36	28,13	30,56	36,88
Cantidad añadida (µg/ml)	-	1,77	4,20	10,52
Tasa de recuperación (%)	-	109,1	110,1	101,1

**Aplicabilidad industrial**

30

La presente invención permite el diagnóstico simple de la diabetes de tipo II en el campo clínico mediante el ensayo de la concentración de la GBP28 natural en una muestra. Además, la presente invención permite realizar un control de los efectos terapéuticos de un agente para la diabetes de tipo II, particularmente un derivado tiazolidina. Además, la utilización del anticuerpo según la presente invención permite el ensayo de la concentración sanguínea de la GBP28 natural, y la GBP28 natural puede someterse a ensayo cuantitativamente sin pretratamiento, tal como un

35



tratamiento térmico, de la GBP28 natural en la muestra. Lo expuesto anteriormente puede conducir a procedimientos de ensayo simplificados y a una capacidad mejorada de procesar los especímenes.

5 Además, el procedimiento según la presente invención puede procesar fácilmente una gran cantidad de especímenes. De esta manera, se proporciona un sistema de ensayo muy efectivo que puede utilizarse en exámenes clínicos para enfermedades geriátricas asociadas a la resistencia a la insulina, tales como la diabetes, la presión sanguínea elevada, la hiperlipidemia o la arterioesclerosis.

**Listado de secuencias**

- 10 <110> REBIO GEN, INC.
- <120> PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNÓSTICO O EL CONTROL DE TRASTORNOS DEL METABOLISMO DE  
15 LOS CARBOHIDRATOS
- <130> PH-1621-PCT
- <160> 2
- 20 <170> PatentIn ver. 2.0
- <210> 1  
<211> 244  
<212> PRT  
25 <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His  
1 5 10 15

Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro  
20 25 30

Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly  
35 40 45  
His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu  
50 55 60

Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile  
65 70 75 80

30 Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly  
85 90 95  
Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg  
100 105 110

Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met  
115 120 125

Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp  
 130 135 140

Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe  
 145 150 155 160  
 Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe  
 165 170 175

Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn  
 180 185 190

Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly  
 195 200 205  
 Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu  
 210 215 220

Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr  
 225 230 235 240

His Asp Thr Asn

5

<210> 2  
 <211> 1804  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 2

ataaaatata acgggagggg nccataaatg cccacaaaa aggccaggat ttntggigt 60  
 ttttctcttt ttctaacaa aglgtttctc cccctnttc tcttttttt ttggttttgt 120  
 tgtttcatgt gtcaatttaa ttaccatat caaantgtcc ccaggagagg gtagagaaga 180  
 aagagaatga gagataagaa ggaggataga cacagaaaat gagagagaag ggggaaagaa 240  
 aaagaggaaa ggagccagag gagagaagct ggttagcatt gaatggagca atctgtgtca 300  
 tcgtacttgg gaaaccaag gatggattct tgncaagtcg actcttgag ctttccctgt 360  
 gcttggctct gtgctcagac atgggaaaat tagaggagtg tcatctgtgc aatcactgaa 420  
 ttcataatct tgnnaggaa anganactac acacagggaa taatgctaag tattacagat 480  
 ttcagggcag aaagatca agslgggctg caatattcag aaaagtctc ctggaaaagt 540  
 tgaatactta gaaagcagct cctagaagta gactctgtct agatggacgg agtcctttgt 600  
 aggtccaac tgggigtgtg tgtgggtct gtctctccat ggctgacagt gcacatgtgg 660  
 attccaataa aatataacgg gaggggncca taaatgccca caaaaaggc caggattttn 720

tgggtlltt ctcctttcc taacaaagtg tttctcccc ctttclclt tttttttgg 780  
 tttgtttgtt lcatgtgtca alltaattac ccatatcaaa nigtccccag gagagggtag 840  
 agaagaaaga gaatgagaga taagaaggag gatagacaca gaaaatgaga gagaaggggg 900  
 aaagaaaaag aggaaaggag ccagaggaga gaagctggtt agcattgaat ggagcaatct 960  
 gtgtcatcgt acttgggaaa cccaaggatg gattcttgnc aagtcgactc ttggagcttt 1020  
 ccctgtgclt ggtcctgtgc tcagacatgg gaaaatlaga ggagtgtcat ctgtgcaatc 1080  
 actgaattca taatcttgnr naggaanga nactacacac agggaaiaat gctaaglatt 1140  
 acagatttca gggcagaaag agatcaaggt gggctgcaat attcagaaaa gctttcctgg 1200  
 aaaagttgaa tacttagaaa gcagctccta gaagtagact ctgctgagat ggacggagtc 1260  
 cttgttaggt cccaactggg tgtgtgtgtg gggctgtgt ctccatggct gacagtgcac 1320  
 atgtggattc caggctcagg atgctgttgc tgggagctgt tctactgcta ttagctctgc 1380  
 ccggtcatga ccaggaaacc acgactcaag ggcccggagt cctgcttccc ctgcccagg 1440  
 gggcctgcac aggttggatg gcgggcatcc cagggcattcc gggccataat ggggccccag 1500  
 gccgtgatgg cagagatggc acccctggtg agaagggtga gaaaggagat ccaggtaaga 1560  
 atgtttctgg cctctttcat cacagaccic ctacactgat ataaactata tgaagtcatt 1620  
 cattattaac taaggcctag acacaggag aaagcaaagc ttggcgtaat catgntcatg 1680  
 taagaatgtt tctggcctct lcatcacag acctcctaca ctgatataaa ctatatgaag 1740  
 tcattcattt ttaactaagg cctagacaca gggagaaagc aaagcttggc gtaatcatgn 1800  
 tcat 1804

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para el diagnóstico de la diabetes de tipo II, que comprende medir un nivel de adiponectina natural (GBP28) que presenta una estructura de trímeros de GBP28 agregados constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28 en su estado natural en una muestra.
- 10 2. Procedimiento para el control de los efectos terapéuticos de los agentes terapéuticos para la diabetes de tipo II, que comprende medir un nivel de adiponectina natural (GBP28) que presenta una estructura de trímeros de GBP28 agregados constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28 en su estado natural en una muestra.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que los agentes terapéuticos para la diabetes de tipo II son los derivados de tiazolidina.
- 20 4. Procedimiento para proporcionar un indicador de la resistencia a la insulina, que comprende medir un nivel de GBP28 natural que presenta una estructura de trímeros de GBP28 agregados constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28 en su estado natural en una muestra.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el indicador de resistencia a la insulina es un indicador de la resistencia a la insulina para los individuos sanos.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la medición se lleva a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que no reaccione con una estructura monomérica de GBP28 pero que reacciona específicamente con GBP28 natural que presenta una estructura de trímeros de GBP28 agregados constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28.
- 35 7. Anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, que no reacciona con una estructura monomérica de GBP28 pero que reacciona específicamente con GBP28 natural que presenta una estructura de trímeros de GBP28 agregados constituida por 4 a 6 trímeros de GBP28.
8. Anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo monoclonal es producido a partir del hibridoma FERM BP-7660 o FERM BP-7661.
9. Kit o reactivo para medir un nivel de GBP28 natural, que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según la reivindicación 7 u 8.

Fig. 1

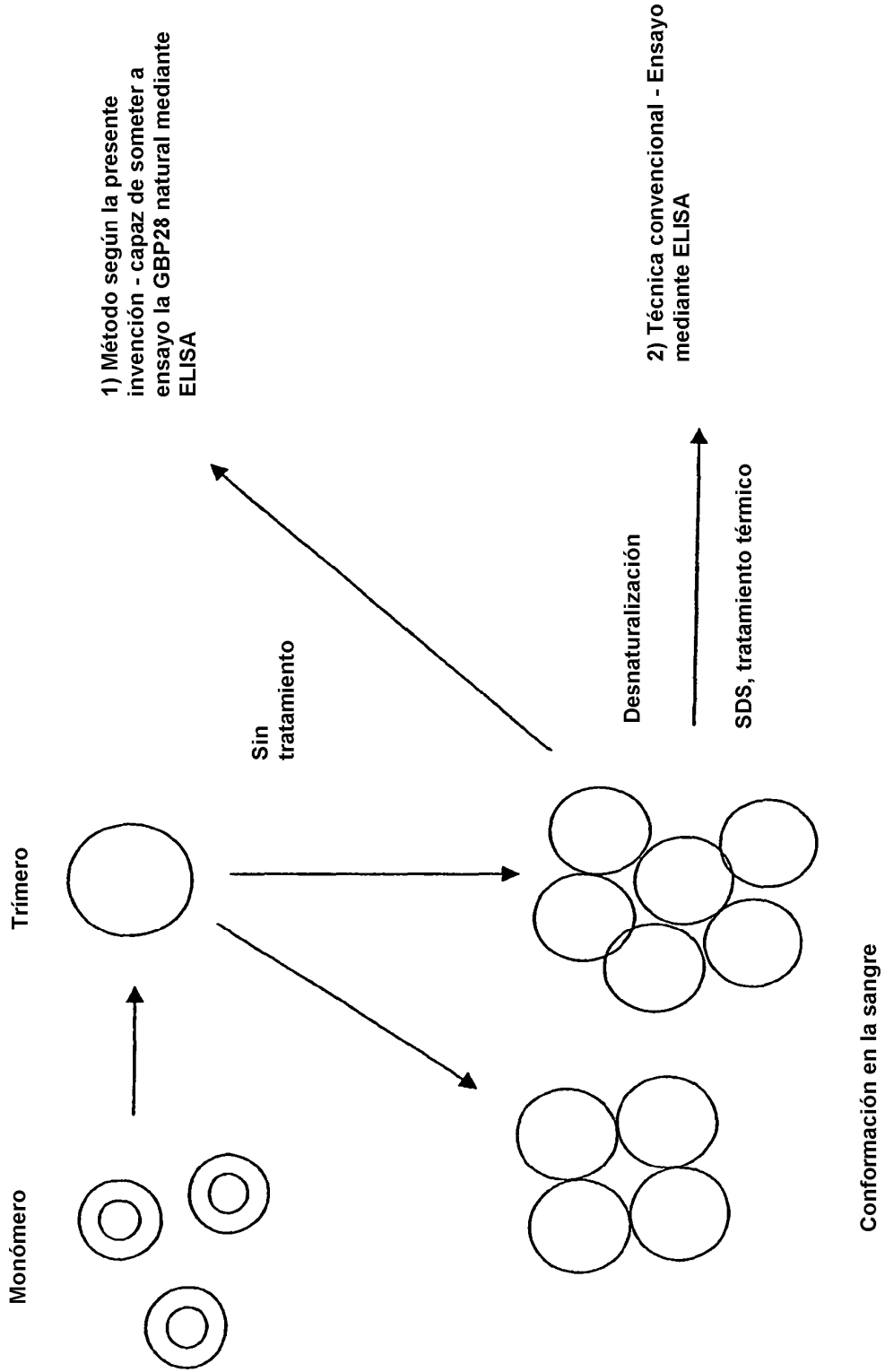


Fig. 2

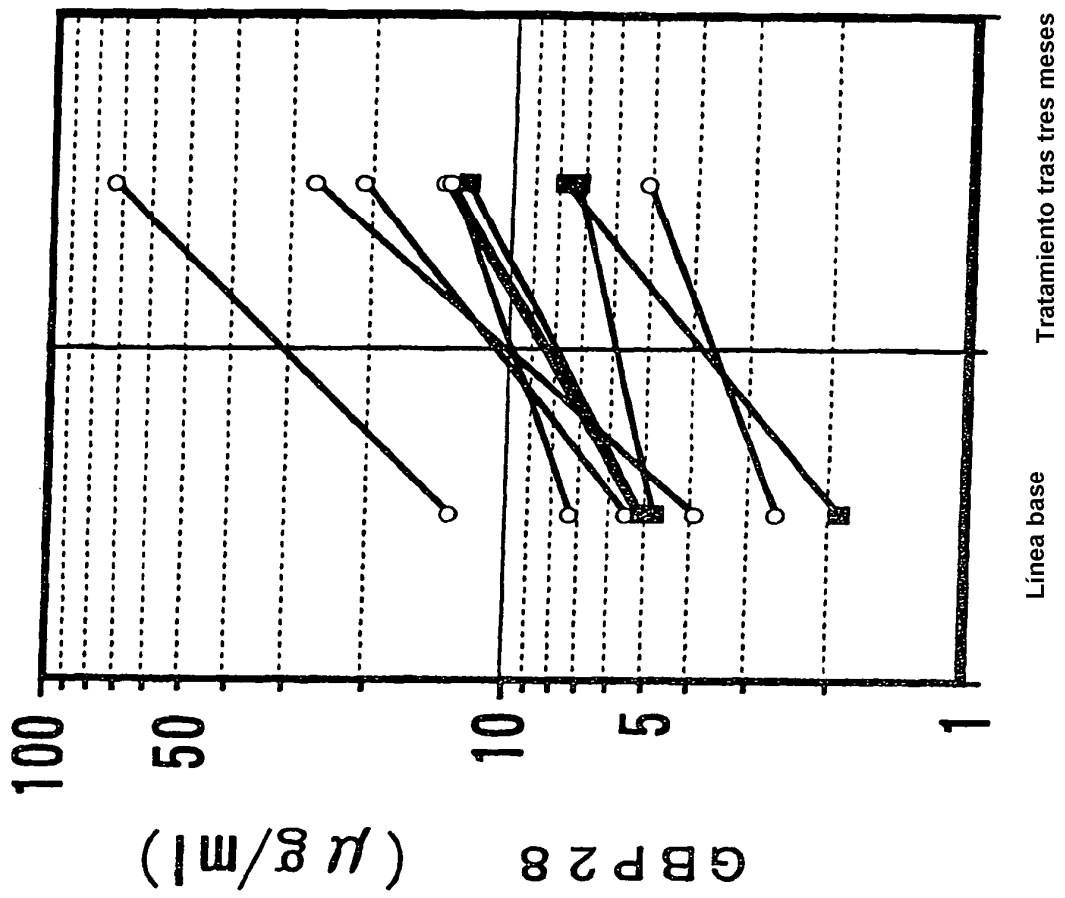


Fig. 3

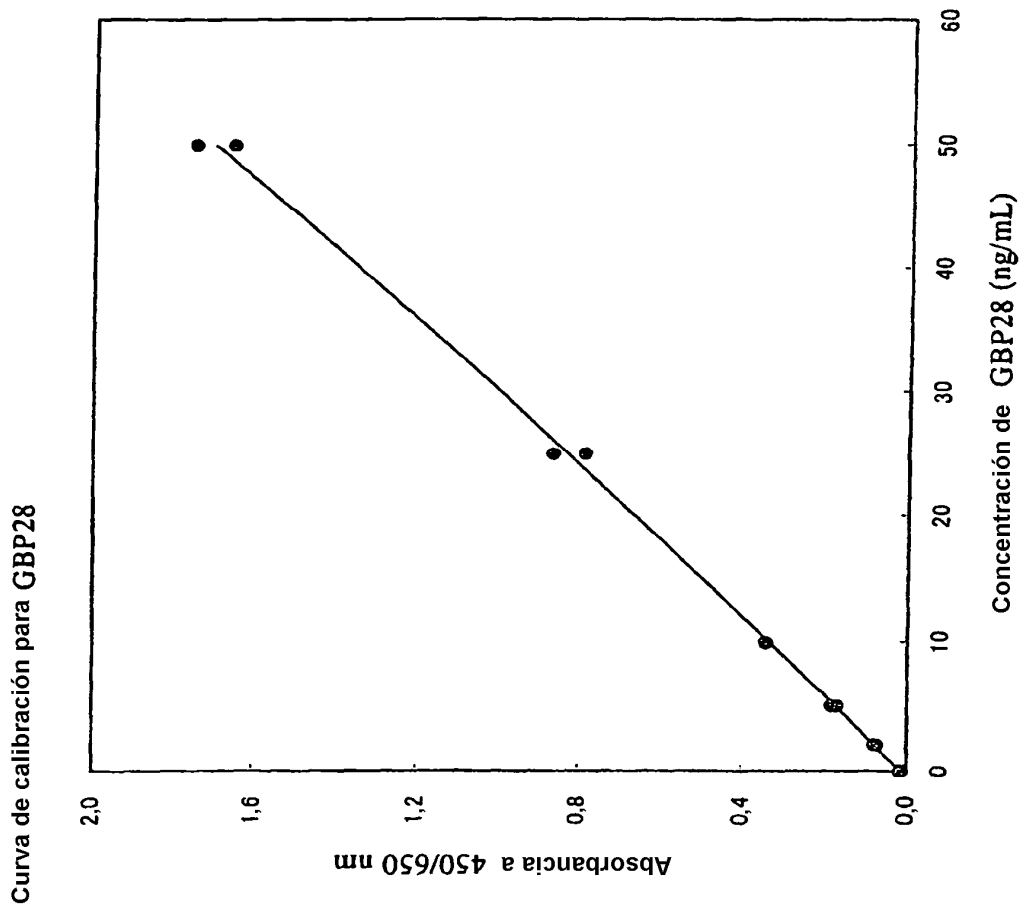


Fig. 4

