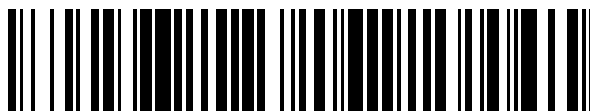


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 188**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04723044 .6**
96 Fecha de presentación: **24.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1607742**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **REACTIVO DE LATEX PARA ANÁLISIS DE ADIPONECTINA Y PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ADIPONECTINA.**

30 Prioridad:
24.03.2003 JP 2003080763

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.02.2012

73 Titular/es:
Mitsubishi Chemical Medience Corporation
2-8, Shibaura 4-chome Minato-ku
Tokyo 108-8559, JP y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

72 Inventor/es:
TACHIKAWA, Tetsuya;
AKAMATSU, Suguru;
SAWAI, Tokio y
NISHIMURA, Ayako

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 188 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

Reactivo de látex para análisis de adiponectina y procedimiento de análisis de adiponectina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un reactivo de látex para análisis de adiponectina y a un procedimiento de análisis de adiponectina. El término "análisis" o "analizar" como se usa en el presente documento, incluye una medida para determinar cuantitativa o semicuantitativamente una cantidad de una sustancia que se va a analizar, y una detección para juzgar la presencia o ausencia de una sustancia que se va a analizar.

Técnica anterior

10 La adiponectina es una proteína secretora compuesta de 244 aminoácidos, que se identificó en 1996 por Matsuzawa (Departamento de medicina interna y ciencia molecular, Universidad de Osaka; Hospital Sumitomo en la actualidad) et al. como producto génico de un gen apM1 (tránsito del gen más abundante adiposo) expresado específicamente en tejidos adiposos (referencias distintas de patente 1 y 2). La adiponectina se encuentra en una concentración alta (aproximadamente de 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml) en sangre humana normal. Aunque la adiponectina se secreta específicamente a partir de los adipocitos, las personas obesas muestran una concentración
15 significativamente baja de los mismos en la sangre, y la adiponectina se reduce en pacientes que padecen enfermedades coronarias o diabetes de tipo II, en particular macroangiopatía diabética. La adiponectina se puede considerar como una molécula implicada en la resistencia a la insulina y en arteriosclerosis. Para evitar enfermedades coronarias, es importante medir la adiponectina de forma rápida y con exactitud.

20 Como procedimiento para medir la adiponectina, se conoce un procedimiento de medición inmunológico que usa un anticuerpo específico para una sustancia que se va a analizar (referencia distinta de patente 3). En el procedimiento de medición inmunológico, se utiliza un radioinmunoensayo o un inmunoensayo de enzima, en el que se usa una sustancia radioactiva o una enzima como marca, para medir un inmunocomplejo formado por una reacción antígeno-anticuerpo (referencias distintas de patente 4-7 y referencias de patente 1 y 2). En el radioinmunoensayo, las instalaciones para la medida son limitadas, ya que se usa una sustancia radioactiva. Además, en general es necesario
25 diluir una muestra hasta 1/500, y se tarda de 20 a 24 horas en llevar a cabo la medida. En el inmunoensayo de enzima, en general es necesario pretratar una muestra con dodecil sulfato de sodio (SDS) y prediluir una muestra hasta aproximadamente 1/5000, y se tarda 2 horas o más en llevar a cabo la medida. Como antes, las medidas de adiponectina convencionales necesitan instalaciones especiales, procedimientos complicados, y un tiempo de medición largo.

30 Cuando se usa sangre, lo que refleja fielmente una patología, como muestra en lo anterior, se necesitan procedimientos convencionales, procedimientos complicados y un tiempo de medición largo, y por tanto, los procedimientos no son adecuados para un ensayo de propósito general o un ensayo multimuestras. Se desea desarrollar un reactivo de medición para un análisis automático en el que se pueda realizar el análisis de forma rápida y conveniente, y las instalaciones para ello no estén limitadas.

35 Más en particular, la referencia de patente 1 da a conocer un procedimiento de ELISA para analizar la adiponectina, en el que se usan un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal preparado usando como inmunógeno adiponectina expresada en un *Escherichia coli* por técnicas de recombinación genética. La referencia de patente 1 dio a conocer que cuando se usó el procedimiento de ELISA para medir una concentración de adiponectina contenida en plasma humano normal, sin un pretratamiento de la muestra de plasma, el valor medido fue menor que el previsto previamente
40 a partir de un resultado obtenido por transferencia de Western. Como motivo de esto, la referencia de patente 1 da a conocer una posibilidad de que se pueda enmascarar un sitio que se va a reconocer por el anticuerpo, ya que la adiponectina en sangre se ensambla con otros componentes del plasma para formar una macromolécula de 290 kDa o más. En el procedimiento de ELISA dado a conocer en la referencia de patente 1, se puede medir la adiponectina en plasma diluyendo el plasma hasta 1/10 con un tampón que contiene SDS, hirviendo el plasma diluido durante 5 minutos, diluyendo el plasma hervido hasta aproximadamente 1/5000 como la concentración final, y el midiendo el plasma diluido a 1/5000. Esto es, el procedimiento de ELISA dado a conocer en la referencia de patente 1 necesita el pretratamiento (el tratamiento con calor en presencia de SDS) y la predilución de una muestra.

50 Como procedimiento de ELISA para analizar la adiponectina que no necesita un pretratamiento de este tipo, la referencia de patente da a conocer un procedimiento de ELISA en el que se usa uno o más anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con una adiponectina de origen natural en sangre (en particular, un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con una estructura trimérica de adiponectina y/o una adiponectina de origen natural que tiene una estructura en la que los trímeros están ensamblados adicionalmente). De acuerdo con la divulgación en la referencia de patente 2, se sabe que la adiponectina en sangre forma una estructura en la que están ensamblados 4 ó 6 trímeros compuestos de 3 monómeros (referencia distinta de patente 8), y no es necesario el
55 pretratamiento de una muestra en el procedimiento de ELISA dado a conocer en la referencia de patente 2, ya que se usan uno o más anticuerpos monoclonales específicos para una adiponectina de origen natural. Sin embargo, la predilución de una muestra es una etapa esencial en el procedimiento de ELISA dado a conocer en la referencia de patente 2. Como ensayo, la referencia de patente 2 ejemplifica, por ejemplo, un procedimiento de fase sólida, un

procedimiento competitivo, un procedimiento de aglutinación, un procedimiento turbidimétrico y un inmunoensayo de enzima tipo sándwich, y da a conocer que ELISA es lo más preferible. Los ejemplos descritos en la referencia de patente 2 no incluyen realizaciones aparte de ELISA.

5 La referencia de patente 3 se refiere a una proteína similar a adiponectina que tiene efectos terapéuticos y/o preventivos sobre arteriosclerosis. La referencia de patente 4 se refiere a una composición inhibitora de crecimiento de músculo liso y una composición para inhibir la expresión de moléculas de adhesión en células del endotelio vascular, comprendiendo cada una el factor secretor específico de tejido apM1 como ingrediente activo. La referencia de patente 5 describe un procedimiento para detectar fosfolípido del bacilo tuberculoso observando la imagen de aglutinación formada cuando el látex que contiene las partículas de látex sensibilizadas que llevan el fosfolípido de
10 bacilo tuberculoso sobre la superficie se hace reaccionar con un fluido corporal.

(referencia No. de patente 1) Biochemical and Biophysical Research Communications, (U.S.A.), 1996, vol. 221, p. 286-289

(referencia No. de patente 2) Gene, (Países Bajos), 1997, vol. 190, p.227-235

15 (referencia No. de patente 3) Hiroshi Hirose et al., N.º 163, "Kessei adiponectin noudo to insulin teikousei: kenjyojin oyobi 2-gata tonyoubyou kanjya ni okeru kentou", "Meeting of the 75th Japanese endocrinology association study, Abstracts", The Japan Endocrine Society, 2002, p.118

(referencia No. de patente 4) Yasuichi Ohmoto et al., "Adiponectin no ELISA kit ni tuite", Bio Clinica, 2002, vol. 17, p. 156-159

20 (referencia No de patente 5) Yasuichi Ohmoto et al., "Adiponectin ELISA kit no kaihatu to kecchu sonzai youshiki no kaiseki", Medical Science Digest, 2002, vol. 28, No. 12, p.40-43

(referencia No. de patente 6) Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, (U.S.A.), 2003, vol. 23, p.85-89

(referencia No. de patente 7) Circulation, (U.S.A.), 2003, vol. 107, p.671-674

(referencia No. de patente 8) Journal of Biochemistry, 1996, vol. 120, p.803-812

(referencia de patente 1) WO 99/21577

25 (referencia de patente 2) WO 03/016906

(referencia de patente 3) EP-A-1 365 022

(referencia de patente 4) EP-A-1 033 134

(referencia de patente 5) JP-A-60111159

Divulgación de la invención

30 Un objeto de la presente invención es remediar las desventajas mencionadas anteriormente de la técnica anterior, y proporcionar un reactivo de análisis (en particular, un reactivo de análisis para un analizador automatizado) en el que no es necesario una predilución o un pretratamiento de un líquido biológico (por ejemplo, sangre, orina, cultivos celulares, extractos de tejido, un líquido cefalorraquídeo, o fluidos secretores, en particular sangre) que se va a analizar, se puede realizar el análisis de forma rápida y conveniente, y las instalaciones para ello no estén limitadas.

35 Como se describe anteriormente, los procedimientos de ELISA conocidos necesitan un pretratamiento (por ejemplo, el tratamiento con calor en presencia de SDS) de una muestra, a menos que se use el anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad especiales (es decir, el anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con una estructura trimérica de adiponectina y/o una adiponectina de origen natural que tiene una estructura en la que los trímeros están ensamblados adicionalmente). Además, los procedimientos de ELISA necesitan una predilución de una muestra. Con
40 el objetivo de desarrollar un procedimiento de análisis de adiponectina rápido y conveniente sin una predilución o un pretratamiento de este tipo, los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos y, como resultado, han encontrado que se puede analizar la adiponectina sin un pretratamiento usando un anticuerpo policlonal anti-adiponectina en un procedimiento de aglutinación de látex, en lugar de los procedimientos de ELISA. Este procedimiento no necesita un predilución de una muestra, y muestra una correlación excelente con el procedimiento
45 de ELISA conocido que necesita el pretratamiento (es decir, el tratamiento con calor en presencia de SDS), como se muestra en los EJEMPLOS con datos experimentales.

En procedimientos de análisis inmunológicos, en particular recientemente, se usan preferentemente anticuerpos monoclonales, debido a una ventaja en reproducibilidad como reactivo. De forma similar, se usan preferentemente anticuerpos monoclonales en procedimientos de aglutinación de látex. La tendencia está respaldada por las
50 referencias de patente 1 y 2, esto es, se usan anticuerpos monoclonales en los procedimientos de ELISA dados a

conocer en las referencias de patente 1 y 2. En contradicción con el enfoque común, los presentes inventores usaron un anticuerpo policlonal, e inesperadamente encontraron que se puede obtener el objeto anterior.

5 El objeto anterior se puede solucionar por la presente invención, es decir, un reactivo de látex para analizar la adiponectina, comprendiendo una suspensión de partículas de látex que lleva un anticuerpo policlonal anti-adiponectina que se une específicamente a adiponectina, en la que el reactivo de látex se selecciona de: (i) un sistema de componentes de un reactivo en el que un tampón y las partículas de látex están contenidos en un reactivo; y (ii) un kit compuesto de dos reactivos en el que el primer reactivo contiene un tampón y el segundo reactivo contiene las partículas de látex.

10 Además, La presente invención se refiere a un procedimiento para analizar adiponectina en un líquido biológico que contenga posiblemente adiponectina, comprendiendo las etapas de: poner el líquido biológico sin un pretratamiento, en el que dicho pretratamiento es desnaturalización química del líquido biológico con dodecilsulfato de sodio, en contacto con un reactivo de látex para analizar la adiponectina como se define anteriormente; y analizar ópticamente un grado de aglutinación de partículas de látex.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 es una gráfica que muestra el resultado obtenido midiendo muestras tomadas de personas sanas, usando el reactivo de látex de la presente invención para analizar la adiponectina.

La figura 2 es una gráfica que muestra una correlación entre el reactivo de látex de la presente invención para analizar la adiponectina y un procedimiento de EIA convencional.

Mejor forma de llevar a cabo la invención

20 En la presente invención, se utiliza una reacción de aglutinación de látex para analizar la adiponectina. La adiponectina, un compuesto que se va a analizar en la presente invención, es una sustancia fisiológicamente activa secretada a partir de tejidos adiposos. La adiponectina es una proteína secretora compuesta de 244 aminoácidos, que se identificó como un producto génico de un gen apM1 (tránsito del gen más abundante adiposo) expresado específicamente en tejidos adiposos (Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 221, p. 286-289, 1996; y Gene, Vol. 190, p. 227-235, 1997), y también denominado GBP28 (proteína de unión a gelatina de 28 kDa) (J. Biochem, vol.120, p 803-812). La adiponectina se encuentra en una concentración de aproximadamente 1 µg/ml a 25 varias decenas de µg/ml en la sangre humana normal. Aunque la adiponectina se secreta específicamente a partir de los adipocitos, las personas obesas muestran una concentración significativamente baja de los mismos en la sangre, y la adiponectina se reduce en pacientes que padecen enfermedades coronarias o diabetes de tipo II, en particular macroangiopatía diabética.

30 La adiponectina se puede considerar como una molécula implicada en la resistencia a la insulina y en arteriosclerosis. Para la prevención de enfermedades coronarias, es importante medir la adiponectina de forma rápida y con exactitud.

35 Una muestra que se puede analizar por la presente invención no está particularmente limitada, siempre que sea un líquido biológico que pueda contener adiponectina. Como muestra, se puede mencionar, por ejemplo, un líquido tomado directamente de un cuerpo vivo [por ejemplo, de la sangre (es decir, sangre completa), orina, un líquido cefalorraquídeo, o fluidos secretores], o un líquido obtenido tratando materiales biológicos tales como órganos, tejidos o células, tomado a partir de un cuerpo vivo [por ejemplo, extractos de órganos, tejidos, o células, o cultivos de tejidos o células].

40 La adiponectina está contenida en una concentración, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml (por ejemplo, de 0,5 a 50 µg/ml, preferentemente de 2 a 30 µg/ml, más preferentemente de 5 a 15 µg/ml) en sangre humana normal.

45 Además, en un líquido procedente de materiales biológicos, que en general se prepara para una prueba de laboratorio clínico, la adiponectina está contenida en una concentración de aproximadamente 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml. Además, una cantidad de un líquido para tratar materiales biológicos, tales como una solución para la extracción o una solución para el cultivo, se puede seleccionar apropiadamente por una prueba piloto o similar, para ajustar una concentración de adiponectina en el líquido procedente de materiales biológicos hasta aproximadamente de 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml.

50 Como antes, un líquido biológico (en particular sangre) que se va a analizar por la presente invención puede contener adiponectina en una concentración de aproximadamente 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml. Se puede analizar un líquido biológico de este tipo, sin predilución, por el reactivo de látex de la presente invención para el análisis de adiponectina y el procedimiento de la presente invención para el análisis de adiponectina.

Como partículas de látex usadas en la presente invención, se pueden mencionar, por ejemplo, partículas de látex de poliestireno, o partículas de látex del copolímero de estireno-sulfato de estireno. Un tamaño de partícula promedio de las partículas de látex que llevan la sustancia de unión a adiponectina se puede seleccionar apropiadamente dentro del

intervalo de 0,05 a 1,0 μm , de conformidad, por ejemplo, con un líquido biológico que se va a analizar, una concentración de adiponectina o un equipo de medición.

5 Cuando se analiza la adiponectina en sangre, una muestra humana normal contiene adiponectina en una concentración alta de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ a varias decenas de $\mu\text{g/ml}$, y una concentración de la misma en sangre es significativamente más baja en una persona obesa. En consecuencia, se puede medir la adiponectina en sangre dentro de un amplio intervalo seleccionando apropiadamente el tamaño de partícula del látex. Por ejemplo, cuando el tamaño de partícula es de 0,1 μm o menos, no siempre se puede asegurar una medida exacta a una concentración clínicamente útil de 5 $\mu\text{g/ml}$ o menos. En cambio, cuando el tamaño de partícula es de 0,5 μm o más, no siempre se puede medir una muestra que muestre un valor normal alto. En el sistema de medición para adiponectina en sangre, son preferibles partículas de látex que tienen de un tamaño de partícula promedio de 0,1 a 0,5 μm .

10 La sustancia de unión a adiponectina usada en la presente invención no está particularmente limitada, siempre que sea un anticuerpo policlonal anti-adiponectina que se une específicamente a adiponectina, y se pueda llevar a cabo una reacción de aglutinación de látex cuando un líquido biológico que contiene adiponectina se pone en contacto con la sustancia de unión a adiponectina llevada sobre las partículas de látex. Un anticuerpo policlonal, que se une específicamente a adiponectina es, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina per se, o se puede usar un fragmento de anticuerpo tal como Fab, Fab', F (ab')₂ o Fv.

15 Como sustancia de unión a adiponectina, se puede usar un anticuerpo preparado usando adiponectina o un derivado de la misma (por ejemplo, un fragmento de adiponectina, o un polipéptido fusionado que contiene adiponectina o un fragmento de la misma) como un inmunógeno. Como anticuerpo, es preferible un anticuerpo policlonal preparado usando adiponectina o un derivado de la misma como inmunógeno que reconozca un epítipo expuesto de adiponectina contenido posiblemente en una muestra. En este sentido, la adiponectina incluye distintas formas de adiponectinas, por ejemplo, un monómero de las mismas, un dímero de las mismas, un trímero de las mismas, o un agregado de las mismas.

20 Como inmunógeno, por ejemplo, se puede usar adiponectina o un derivado de las mismas preparado por técnicas de recombinación genética o una adiponectina de origen natural.

25 Se puede preparar el anticuerpo preparado usando como inmunógeno adiponectina o un derivado de la misma preparado por técnicas de recombinación genética, por ejemplo, por un procedimiento descrito en el documento WO99/21577. Más en particular, se usa un huésped apropiado tal como E. coli, levadura, células de insecto, o células de mamífero para expresar adiponectina o un derivado de la misma. Cuando se usa E. coli como huésped, se puede obtener adiponectina o un derivado de la misma como fracción soluble, o cuerpos de inclusión en el cuerpo celular. Se puede solubilizar la adiponectina o un derivado de la misma acumulado en los cuerpos inclusión con un agente desnaturante apropiado tal como clorhidrato de guanidina o urea y, replegarlo para obtener adiponectina o un derivado de la misma que se puede usar como inmunógeno.

30 Se puede preparar el anticuerpo preparado usando como inmunógeno una adiponectina de origen natural, por ejemplo, por un procedimiento descrito en el documento WO03/016906. Más en particular, se puede preparar la adiponectina que se puede usar como inmunógeno usando una actividad de unión a gelatina de adiponectina, por ejemplo, aplicando una gran cantidad de plasma humano a una columna inmovilizada de gelatina. Como adiponectina de origen natural contenida posiblemente en una muestra, se puede mencionar, por ejemplo, un monómero de la misma, un dímero de la misma, un trímero de la misma, un agregado de la misma, o una región globular de la misma generada por una digestión de proteasas.

35 Se puede obtener el anticuerpo policlonal inmunizando un animal, tal como un conejo, con el inmunógeno preparado de acuerdo con un procedimiento ordinario.

40 Se pueden sensibilizar partículas de látex de acuerdo con un procedimiento ordinario. Se usa un anticuerpo como sustancia de unión a adiponectina, y se lleva a cabo la sensibilización uniendo física o químicamente el anticuerpo a las partículas de látex.

45 La forma del reactivo de látex de la presente invención para analizar adiponectina no está particularmente limitada, siempre que contenga una suspensión de partículas de látex que llevan una sustancia que se une específicamente a adiponectina. El reactivo de látex de la presente invención es un sistema de componentes de un reactivo en el que un tampón y las partículas de látex sensibilizadas con la sustancia de unión a adiponectina están contenidos en un reactivo, o un sistema de componentes de dos reactivos (es decir, un kit compuesto de dos reactivos) en el que el primer reactivo contiene un tampón y el segundo reactivo contiene las partículas de látex sensibilizadas con la sustancia de unión a adiponectina.

50 En el procedimiento de la presente invención para analizar adiponectina, se obtiene un líquido biológico que contiene posiblemente adiponectina, y después, el líquido biológico sin predilución y/o pretratamiento (es decir, mientras se mantiene el estado en el que se obtiene el líquido biológico) se pone en contacto con una suspensión de látex que lleva una sustancia que se une específicamente a adiponectina.

Por ejemplo, cuando se usa un analizador automatizado en el procedimiento de la presente invención, después de que se obtiene un líquido biológico, no se lleva a cabo la predilución y/o el pretratamiento antes de que se aplique el líquido biológico en el analizador automatizado. Más en particular, después de que se obtiene el líquido biológico, el líquido biológico sin predilución y/o pretratamiento (es decir, mientras se mantiene el estado en el que se obtiene el líquido biológico) se pone en contacto con una suspensión de látex que lleva una sustancia que se une específicamente a adiponectina en el analizador automatizado.

El procedimiento de la presente invención, que usa preferentemente un analizador automatizado, comprende las etapas de:

poner el líquido biológico sin un pretratamiento, en el que dicho pretratamiento es desnaturalización química del líquido biológico con dodecilsulfato de sodio, en contacto con un reactivo de látex para analizar la adiponectina en un analizador automatizado; y analizar ópticamente un grado de aglutinación de partículas de látex.

El término "predilución" como se usa en el presente documento, significa una dilución que se lleva a cabo después de obtener un líquido biológico y antes de poner el líquido biológico en contacto con la suspensión de las partículas de látex. La predilución incluye, por ejemplo, una dilución de una muestra, requerido en general en un ensayo inmunológico convencional (por ejemplo, un radioinmunoensayo o un inmunoensayo de enzimas), tal como una etapa de dilución para solubilización.

En el presente procedimiento, el líquido biológico no se desnaturaliza químicamente con dodecil sulfato de sodio. El término "pretratamiento" como se usa en el presente documento, incluye distintos tratamientos que se llevan a cabo después de obtener un líquido biológico y antes de poner el líquido biológico en contacto con la suspensión de partículas de látex (preferentemente el reactivo de látex de la presente invención para analizar la adiponectina). Los tratamientos incluyen, por ejemplo, una separación física o química de impurezas del líquido biológico, y una desnaturalización química del líquido biológico [por ejemplo, una desnaturalización de una muestra con un agente de solubilización o un detergente (por ejemplo, dodecil sulfato de sodio), requerido en un inmunoensayo de enzimas].

En este sentido, como suspensión de partículas de látex, cuando se usa el reactivo de látex de la presente invención que consiste en el sistema de componentes de dos reactivos en el que el primer reactivo contiene un tampón y el segundo reactivo contiene las partículas de látex sensibilizadas con la sustancia de unión a adiponectina, en general un líquido biológico se pone en contacto con el primer reactivo, y la mezcla se pone en contacto con el segundo reactivo. En este caso, el líquido biológico se diluye con el tampón como el primer reactivo. La dilución es una etapa esencial para una incubación de 5 minutos en un analizador automatizado general y, por lo tanto, no está incluido en la "predilución" anterior.

Cuando se usa un radioinmunoensayo o un inmunoensayo de enzimas convencional en el análisis de la adiponectina contenida en distintos líquidos biológicos tales como sangre, una etapa de dilución de una muestra hasta, por ejemplo, de 1/500 a 1/5000 es una etapa esencial. Además, una etapa de tratamiento de una muestra con un agente de solubilización o un detergente [por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS)] es una etapa esencial en un inmunoensayo de enzimas.

En cambio, en el procedimiento de la presente invención para analizar la adiponectina, se puede llevar a cabo una reacción de aglutinación de látex usando un líquido biológico original sin predilución o pretratamiento, por ejemplo, seleccionando apropiadamente un tamaño de partícula de las partículas de látex. Cuando se analiza la adiponectina en sangre, es preferible un tamaño de partícula de 0,1 a 0,5 μm .

En el procedimiento de la presente invención para analizar la adiponectina, se usan partículas de látex que llevan una sustancia que se une específicamente a adiponectina para llevar a cabo una reacción de aglutinación, y se analiza ópticamente un grado de la aglutinación (medido en particular) para analizar (medida en particular) una cantidad de adiponectina contenida en un líquido biológico tal como sangre. El análisis óptico de un grado de la aglutinación de partículas de látex se puede llevar a cabo, por ejemplo, por una observación visual, o un instrumento óptico para medir una intensidad de luz dispersada, una absorbancia, o una intensidad de luz transmitida. Una longitud de onda de medición preferida es de 300 a 800 nm. Se puede llevar a cabo el grado de aglutinación, de acuerdo con un procedimiento conocido, seleccionando un tamaño (tamaño de partícula promedio) de la partícula de látex, una concentración de partículas de látex, o un tiempo de reacción, y midiendo un incremento o disminución en una intensidad de luz dispersada, una absorbancia, o una intensidad de luz transmitida, o una combinación de las mismas.

En general, se puede seleccionar apropiadamente una concentración de partículas de látex sensibilizadas con la sustancia de unión a adiponectina, que está contenida en un sistema de reacción de aglutinación de látex, de acuerdo, por ejemplo, con una concentración de aditivos coexistentes tales como sales, proteínas o sacáridos. La concentración de partículas de látex (como concentración final en un sistema de reacción) pueden ser preferentemente de 0,05 a 10 mg/ml, más preferentemente de 0,1 a 2 mg/ml. Cuando la concentración de partículas de látex es demasiado baja, la reacción de aglutinación no siempre se puede medir con exactitud en un intervalo de concentración baja, y por lo tanto, a veces la reproducibilidad se reduce. Cuando la concentración es demasiado alta, la reacción de aglutinación no siempre se puede medir con exactitud en un intervalo de concentración alta, y por lo tanto, a veces la reproducibilidad se reduce.

En la presente invención, se puede medir con más exactitud la reacción de aglutinación de partículas de látex y se puede ampliar un intervalo medible en una concentración baja y en una concentración alta, ajustando otros factores que pueden afectar a la reacción de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con la sustancia de unión a adiponectina. Como factores, se pueden mencionar, por ejemplo, una concentración de partículas de látex, una cantidad de un anticuerpo sensibilizado sobre las partículas de látex, o un tamaño de partícula de la partícula de látex.

Se puede llevar a cabo la reacción de aglutinación de látex en el procedimiento de la presente invención para analizar la adiponectina bajo las mismas condiciones que las de la reacción de aglutinación de látex convencional. Como medio de reacción, se pueden seleccionar apropiadamente distintos tampones de acuerdo con un análisis de adiponectina en distintos líquidos biológicos. Cuando se analiza la adiponectina en sangre, una fuerza iónica y un pH del tampón no están particularmente limitados, siempre que el tampón no inactive la adiponectina en sangre y no inhiba la reacción de aglutinación de látex. Como tampón, por ejemplo, se puede usar un tampón de Good, un tampón de glicina, o un tampón tris. El pH en la reacción es preferentemente de 5 a 10, más preferentemente 6 - 8. La temperatura de reacción es preferentemente de 0 a 50 °C, más en particular de 20 a 40 °C. El tiempo de reacción se puede seleccionar apropiadamente.

15 Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante, pero no se limita de ninguna manera a, los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de reactivo para medición de adiponectina

(1) Preparación de líquido de látex sensibilizado con anticuerpo anti-adiponectina

Se disolvió un anticuerpo policlonal de adiponectina anti-humano procedente de un conejo en un tampón tris de 0,01 mol/l (pH 8,0) a una concentración de 0,5 mg/ml. A 9 ml de la solución de anticuerpo policlonal, se le añadió 1 ml de una solución de látex de poliestireno (tamaño de partícula promedio = 0,2 µm, contenido en sólido = 10% en peso), y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadió a la mezcla un tampón tris (pH 8,0) que contenía un 0,5% en peso de albúmina sérica bovina. Se agitó todo a temperatura ambiente durante 60 minutos y se centrifugó a 20000 rpm. Se suspendió el precipitado resultante, es decir, látex, en 10 ml de un tampón tris (pH 8,0) para preparar un líquido de látex sensibilizado con el anticuerpo anti-adiponectina.

En este sentido, se preparó el anticuerpo policlonal anterior por el procedimiento descrito en el ejemplo 1 del documento WO99/21577. Esto es, era un anticuerpo policlonal obtenido usando como inmunógeno adiponectina preparada por técnicas de recombinación genética.

En este ejemplo, se prepararon tres líquidos (N.º de lotes de 01 a 03) de látex sensibilizado con el anticuerpo anti-adiponectina de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente, y se evaluaron en el siguiente ejemplo 2.

(2) Preparación de tampón

Se añadió cloruro de sodio a una concentración de un 0,9% en peso a un tampón tris de 0,1 mol/l (pH8,0) que contenía un 0,5% en peso de albúmina sérica bovina para preparar un tampón.

(3) Reactivo para medición de antígeno de adiponectina humana

Se construyó un reactivo, usado en este ejemplo, para medición de una adiponectina humana como un sistema de componentes de dos reactivos compuesto del tampón preparado en el ejemplo 1 (2) como el primer reactivo, y el látex sensibilizado con el anticuerpo anti-adiponectina preparado en el ejemplo 1 (1) como el segundo reactivo.

40 (4) Líquidos de antígeno de adiponectina estándar

Se diluyó un suero que contenía adiponectina en una concentración alta, que se recogió a partir de un sujeto no obeso, con solución salina fisiológica para preparar líquidos de antígeno de adiponectina estándar que contenían concentraciones conocidas de adiponectina.

Ejemplo 2: Medición de adiponectina en sangre

45 (1) Medición de adiponectina en sangre

A 2 µl de cada muestra que se iba a medir (sangre recogida de un sujeto delgado), se le añadieron 90 µl del tampón preparado en el ejemplo 1(2), y se dejó que la mezcla se mantuviera a 37 °C. A la mezcla, se le añadieron 90 µl del líquido de látex sensibilizado con el anticuerpo anti-adiponectina preparado en el ejemplo 1(1) y se agitó. Desde la última adición, se midió una absorbancia a la longitud de onda de 570 nm durante 5 minutos. Una cantidad de cambio en la absorbancia entre los mismos se consideró como una cantidad de cambio en la absorbancia (ΔAbs). Se preparó una curva de calibración sobre la base de cada ΔAbs de los líquidos de antígeno de adiponectina estándar y la

ES 2 375 188 T3

concentración de los mismos. Se usó la curva de calibración para calcular una cantidad de adiponectina de los Δ Abs de cada muestra. Se llevó a cabo la medida usando un analizador automatizado (Hitachi 7170, Hitachi Ltd.).

El resultado se muestra en la tabla 1 y la figura 1. Como se muestra en la tabla 1 y en la figura 1, se confirmó que los N.º de lote de líquidos de látex sensibilizado de 01 a 03 se pueden usar para medir la adiponectina desde una concentración baja hasta una concentración alta con respecto a los valores teóricos de adiponectina diluida.

5

Tabla 1

Lote de reactivo	Lote 01	Lote 02	Lote 03
(a) µg/ml	(b) Absx10 ⁴	(b) Absx10 ⁴	(b) Absx10 ⁴
0,00	-3	-2	-2
0,20	13	10	12
0,39	26	25	28
0,79	52	52	54
1,18	81	78	82
1,57	108	106	110
1,97	135	133	138
2,36	162	164	164
2,75	191	188	196
3,14	220	215	220
3,54	248	245	254
3,93	275	273	284
7,86	570	567	582
11,79	860	844	877
15,72	1161	1140	1182
19,65	1443	1415	1456
23,58	1707	1680	1722
27,51	1947	1895	1982
31,44	2164	2110	2201
35,37	2342	2311	2405
39,30	2497	2486	2562
47,16	2679	2626	2724
70,74	3071	2990	3115
94,32	3134	3052	3189
117,90	3042	2968	3138
[(a): Valor teórico de adiponectina diluida; y (b): Sensibilidad]			

(2) Determinación de sensibilidad detectable mínima (límite de detección bajo)

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 2(1) excepto porque se recogieron las muestras que se iban a medir a partir de personas sanas.

El resultado se muestra en la tabla 2. En la tabla 2, "N", "MAX", "MIN", "INTERVALO", "MEDIA", "DE", y "CV" significan "número de sujetos medidos", "valor máximo", "valor mínimo", "diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo", "valor medio", "desviación estándar" y "coeficiente de variación", respectivamente.

5 Como se muestra en la tabla 2, se confirmó que una concentración en la que el valor de "MEDIA+2DE" de Δ Abs (0 μ g/ml) no coincidía con el valor de "MEDIA-2DE" fue de 0,1 μ g/ml.

Tabla2

	0 µg/ml	0,1 µg/ml	0,2 µg/ml	0,3 µg/ml	0,4 µg/ml	0,5 µg/ml	0,6 µg/ml	0,7 µg/ml	0,8 µg/ml	0,9 µg/ml	1 µg/ml
1	0,000	0,061	0,253	0,314	0,406	0,429	0,566	0,620	0,834	0,933	0,948
2	0,000	0,038	0,161	0,337	0,436	0,505	0,543	0,650	0,826	0,750	1,016
3	0,000	0,092	0,260	0,299	0,444	0,513	0,574	0,673	0,826	0,902	1,032
4	0,000	0,061	0,184	0,322	0,375	0,444	0,605	0,704	0,742	0,902	1,085
5	0,000	0,077	0,237	0,329	0,329	0,513	0,528	0,704	0,773	0,895	1,032
6	0,000	0,100	0,253	0,360	0,375	0,482	0,582	0,658	0,811	0,895	1,032
7	0,008	0,100	0,222	0,314	0,436	0,505	0,536	0,696	0,795	0,955	0,971
8	0,000	0,107	0,191	0,337	0,398	0,498	0,566	0,681	0,818	0,917	0,986
9	0,000	0,061	0,138	0,314	0,436	0,482	0,612	0,643	0,818	0,910	1,039
10	0,000	0,123	0,207	0,276	0,360	0,498	0,566	0,696	0,826	0,948	1,001
N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MAX	0,008	0,123	0,260	0,360	0,444	0,513	0,612	0,704	0,834	0,955	1,085
MIN	0,000	0,038	0,138	0,276	0,329	0,429	0,528	0,620	0,742	0,750	0,948
INTERVALO	0,008	0,085	0,122	0,084	0,115	0,084	0,084	0,084	0,092	0,205	0,137
MEDIA	0,001	0,082	0,211	0,320	0,399	0,487	0,568	0,672	0,807	0,901	1,014
DE	0,003	0,027	0,042	0,023	0,039	0,029	0,027	0,029	0,029	0,057	0,039
CV	316,23 %	32,36 %	19,83 %	7,17 %	9,78 %	5,93 %	4,84 %	4,29 %	3,60 %	6,34 %	3,86 %
MEDIA-2DE	-	0,03	0,13	0,27	0,32	0,43	0,51	0,61	0,75 -	0,79	0,94
MEDIA+2DE	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(3) Confirmación de correlación con el procedimiento EIA

Como el procedimiento de látex de la presente invención, se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 2(1) excepto porque se recogieron las muestras que se iban a medir a partir de personas sanas.

5 Se llevó a cabo un procedimiento EIA usando un reactivo de laboratorio disponible comercialmente (kit de ELISA de adiponectina humana; Otsuka Pharmaceutical). El reactivo de ELISA es un reactivo disponible comercialmente sobre la base de un procedimiento de ELISA descrito en el documento WO99/21577. En el reactivo de ELISA, se usa una combinación de un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal preparada usando como inmunógeno adiponectina preparada por técnicas de recombinación genéticas como anticuerpos anti-adiponectina, y un pretratamiento (un tratamiento con calor en presencia de SDS) de una muestra y una etapa de dilución son etapas
10 esenciales.

El resultado se muestra en la figura 2. Como se muestra en la figura 2, la correlación entre el procedimiento de látex de la presente invención y el procedimiento EIA usando el reactivo de laboratorio disponible comercialmente se mostró como la siguiente ecuación:

$Y = 0,9938x - 0,0015$ (R = 0,9889)

15 y se confirmó una correlación alta.

(4) Confirmación de efectos de impurezas

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 2(1) excepto porque las muestras preparadas añadiendo distintas impurezas (bilirrubina F, bilirrubina C, hemoglobina, turbidez de formazina, intrafat, o factor reumatoide) a concentraciones deseadas para muestras tomadas a partir de personas sanas se usaron como las muestras que se
20 iban a medir.

Los resultados se muestran en de la tabla 3 a la tabla 14. Se confirmó que el efecto de cada impureza [bilirrubina F, bilirrubina C, hemoglobina, turbidez de formazina, intrafat, o factor reumatoide (RF)] en cada concentración estaba dentro de un $\pm 10\%$.

Tabla 3

bilirrubina F	(a) (mg/dl)	muestra 1	
		(b) ($\mu\text{g/ml}$)	(C) (%)
0/5	0,0	2,14	100,0 %
1/5	6,0	2,10	98,0 %
2/5	12,0	2,09	97,5 %
3/5	18,0	2,09	97,5 %
4/5	24,0	2,09	97,5 %
5/5	30,0	2,06	96,3 %

[(a): Concentración añadida, (b): Valor medido, y (c): Tasa de recuperación; en las tablas de 3 a 14]

25

Tabla 4

bilirrubina F	(a) (mg/dl)	muestra 2	
		(b) ($\mu\text{g/ml}$)	(C) (%)
0/5	0,0	6,45	100,0 %
1/5	6,0	6,45	100,1 %
2/5	12,0	6,42	99,5 %
3/5	18,0	6,41	99,3 %
4/5	24,0	6,43	99,6 %
5/5	30,0	6,44	99,8. %

Tabla 5

bilirrubina C	(a) (mg/dl)	muestra 1	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	2,07	100,0 %
1/5	6,0	2,05	99,2 %
2/5	12,0	2,08	100,5 %
3/5	18,0	2,05	99,2 %
4/5	24,0	2,06	99,7 %
5/5	30,0	2,08	100,6 %

Tabla 6

bilirrubina C	(a) (mg/dl)	muestra 2	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	6,41	100,0 %
1/5	6,0	6,41	100,0 %
2/5	12,0	6,43	100,3 %
3/5	18,0	6,45	100,6 %
4/5	24,0	6,41	99,9 %
5/5	30,0	6,37	99,4 %

5

Tabla 7

hemoglobina	(a) (mg/dl)	muestra 1	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	2,06	100,0 %
1/5	100,0	2,06	100,0 %
2/5	200,0	2,04	99,2 %
3/5	300,0	2,06	100,3 %
4/5	400,0	2,08	101,1 %
5/5	500,0	2,06	100,2 %

Tabla 8

hemoglobina	(a) (mg/dl)	muestra 2	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	6,40	100,0 %
1/5	100,0	6,43	100,5 %
2/5	200,0	6,26	97,9 %
3/5	300,0	6,38	99,7 %
4/5	400,0	6,39	99,8 %
5/5	500,0	6,41	100,3 %

Tabla 9

Turbidez de formazina	(a) (turbidez)	muestra 1	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	2,12	100,0 %
1/5	400,0	2,13	100,5 %
2/5	800,0	2,07	97,8 %
3/5	1200,0	2,06	97,0 %
4/5	1600,0	2,11	99,7 %
5/5	2000,0	2,07	97,6 %

Tabla 10

Turbidez de formazina	(a) (turbidez)	muestra 2	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	6,38	100,0 %
1/5	400,0	6,37	99,8 %
2/5	800,0	6,34	99,4 %
3/5	1200,0	6,35	99,4 %
4/5	1600,0	6,38	99,9 %
5/5	2000,0	6,94	100,9 %

5

Tabla 11

intrafat	(a) (%)	muestra 1	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	2,10	100,0 %
1/5	1,0	2,12	100,8 %
2/5	2,0	2,10	100,0 %
3/5	3,0	2,14	101,9 %
4/5	4,0	2,15	102,2 %
5/5	5,0	2,13	101,3 %

Tabla 12

intrafat	(a) (%)	muestra 2	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	6,42	100,0 %
1/5	1,0	6,42	100,0 %
2/5	2,0	6,44	100,3 %
3/5	3,0	6,34	98,7 %
4/5	4,0	6,32	98,4 %
5/5	5,0	6,31	98,2 %

Tabla 13

RF	(a) (IU/ml)	muestra 1	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	2,10	100,0 %
1/5	50,0	2,06	98,1 %
2/5	100,0	2,05	97,3 %
3/5	150,0	2,10	100,0 %
4/5	200,0	2,03	96,7 %
5/5	250,0	2,12	100,6 %

Tabla 14

RF	(a) (IU/ml)	muestra 2	
		(b) (µg/ml)	(C) (%)
0/5	0,0	6,42	100,0 %
1/5	50,0	6,30	98,2 %
2/5	100,0	6,39	99,6 %
3/5	150,0	6,27	97,8 %
4/5	200,0	6,30	98,2 %
5/5	250,0	6,42	100,1 %

Aplicabilidad Industrial

- 5 De acuerdo con la presente invención, en el análisis para adiponectina contenida en un líquido biológico (preferentemente sangre) sobre la base de una reacción de aglutinación de látex usando partículas de látex, el intervalo medible se puede ampliar desde una concentración baja hasta una concentración alta sin un pretratamiento o predilución de una muestra. Además, el análisis de la presente invención se puede llevar a cabo de forma rápida y conveniente, y las instalaciones para ello no están limitadas.
- 10 Ahora se usa ampliamente un analizador automatizado que pueda manipular muchas muestras en un periodo de tiempo corto, y se desea una alta sensibilidad. En consecuencia, se usa ampliamente un procedimiento de aglutinación de látex que haga uso de la reacción con una partícula de látex que lleve un anticuerpo (o un antígeno). El análisis de la presente invención no necesita un pretratamiento y/o una predilución, y por tanto, el análisis se puede realizar en un periodo de tiempo corto (por ejemplo, aproximadamente de 10 a 15 minutos). El reactivo de látex de la presente invención para analizar la adiponectina (preferentemente adiponectina en sangre) es adecuado para un reactivo de análisis para un analizador automatizado.
- 15

Aunque se ha descrito la presente invención con referencia a realizaciones específicas, son posibles distintos cambios y modificaciones obvias para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de látex para analizar la adiponectina que comprende una suspensión de partículas de látex que lleva un anticuerpo policlonal anti-adiponectina que se une específicamente a adiponectina, en el que el reactivo de látex se selecciona de:
 - 5 (i) un sistema de componentes de un reactivo en el que un tampón y las partículas de látex están contenidos en un reactivo; y
 - (ii) un kit compuesto de dos reactivos en el que el primer reactivo contiene un tampón y el segundo reactivo contiene las partículas de látex.
- 10 2. Un procedimiento para analizar la adiponectina en un líquido biológico que contiene posiblemente adiponectina, comprendiendo las etapas de:

poner el líquido biológico sin un pretratamiento, en el que dicho pretratamiento es desnaturalización química del líquido biológico con dodecilsulfato de sodio, en contacto con un reactivo de látex para analizar la adiponectina como se define en la reivindicación 1; y

analizar ópticamente un grado de aglutinación de partículas de látex.

15

FIG. 1

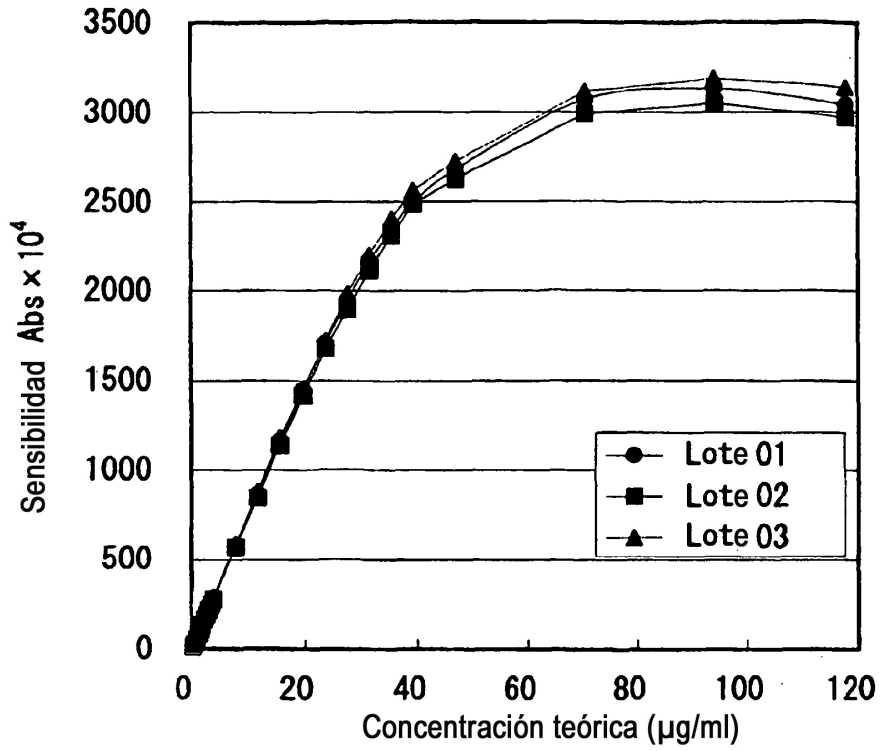


FIG. 2

