

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 259**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09004308 .4**
96 Fecha de presentación: **15.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **2071333**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Método para analizar selectivamente multímeros de adiponectina**

30 Prioridad:
15.10.2003 JP 2003354930

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.06.2012

73 Titular/es:
SEKISUI MEDICAL CO., LTD.
13-5, NIHONBASHI 3-CHOME CHUO-KU
TOKYO 103-0027, JP y
TOUDAI TLO, LTD.

72 Inventor/es:
Ebinuma, Hiroyuki;
Yago, Hirokazu;
Akimoto, Yuka;
Myazaki, Osamu;
Kadowaki, Takashi;
Yamauchi, Toshimasa y
Hara, Kazuo

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

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).

ES 2 383 259 T3

DESCRIPCIÓN

Método para analizar selectivamente multímeros de adiponectina

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al análisis selectivo de formas multiméricas de adiponectina (denominadas en lo sucesivo multímeros de adiponectina) presentes en una muestra biológica.

10 **Técnica Anterior**

El documento WO 03/016906 describe un método de inmunoanálisis de Ad PMB en una muestra biológica.

Waki *et al.*, J. Biol. Chem. 278, 40352-40363 describen un método de uso de anticuerpos para detectar multímeros de adiponectina.

15 La adiponectina es una hormona sensible a la insulina que es secretada específicamente por las células grasas, y está presente en la sangre a un nivel relativamente elevado (5 a 10 µg/mL). Los autores de la presente invención han informado previamente sobre un efecto fisiológico de la adiponectina, esto es, la disminución del nivel de adiponectina es una causa de la diabetes tipo II después de la obesidad o una causa para el trastorno del metabolismo de los azúcares o lípidos en la diabetes lipoatrófica (Documento no de Patente 1). Se han propuesto
20 aplicaciones médicas de la adiponectina, incluyendo el diagnóstico de trastornos del metabolismo del azúcar; en particular, el seguimiento del efecto terapéutico de un derivado de tiazolidina que es un fármaco mejorador de la resistencia a la insulina (Documento de Patente 1), y la dosificación de supresor fibrogenético hepático utilizando el efecto de adiponectina, incluyendo la supresión de la activación y el crecimiento de las células estrelladas y la supresión de la producción de matriz extracelular (Documento de Patente 2).

25 La adiponectina se clasifica en la familia del C1q (Complemento 1q) sobre la base de su estructura, y por lo tanto tiene un dominio similar al colágeno, que es un rasgo característico de la familia C1q. Se ha informado de que la adiponectina forma multímeros basados en unidades de trímeros (Documentos no de Patente 2 y 3).

30 Se ha informado sobre la relación entre las estructuras de la adiponectina y el efecto fisiológico, la actividad, etc. Tsao *et al.* han informado de que el efecto de la activación de NF-κB se observa solo en multímeros de adiponectina que son mayores que un trímero pero no se observa en un trímero y en un dominio globular que carece del dominio similar al colágeno. Utpal *et al.* han informado de que sólo la adiponectina de peso molecular alto se reduce significativamente mediante la administración de insulina o glucosa, y que la adiponectina en la que la cisteína en el
35 dominio similar al colágeno es sustituida por serina o la adiponectina que ha experimentado un tratamiento de reducción exhiben un fuerte efecto de reducción del azúcar en sangre, pero no se observa sustancialmente un efecto de reducción del azúcar en sangre en la adiponectina que no ha experimentado tratamiento de reducción y en la adiponectina globular (Documento No de Patente 4).

40 Sin embargo, la adiponectina empleada en estos estudios referidos se produce a través de la recombinación de genes mediante el uso de *E. coli* o similares. Por lo tanto, el comportamiento o la acción de la adiponectina que se produce en un organismo no pueden reflejarse con precisión. Además, se sabe que el nivel sanguíneo de la adiponectina difiere entre los sexos. En comparación con los hombres, se ha informado de que las mujeres tienen un nivel de adiponectina en sangre significativamente alto (Documento No de Patente 5). Una prueba empleando suero
45 de ratón ha revelado que las hembras tienen un contenido particularmente alto en adiponectina de alto peso molecular (Documento No de Patente 4).

Como se ha descrito anteriormente, a través de la medición solo de la cantidad total de adiponectina, no puede obtenerse suficiente información sobre la relación entre las estructuras de la adiponectina y los efectos fisiológicos o las enfermedades. Por lo tanto, todavía existe la demanda de un método para analizar selectivamente los
50 multímeros de adiponectina presentes en una muestra biológica.

En un método de la técnica anterior para analizar la adiponectina, una muestra que se vaya a medir se hierva en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) antes de realizar el inmunoanálisis (Documento de Patente 3). El
55 tratamiento de ebullición permite la exposición de un sitio de reconocimiento de anticuerpos de la adiponectina que ha estado oculto estereoestructuralmente, con el fin de determinar inmunológicamente la cantidad total de adiponectina. Por lo tanto, este método no está dirigido a analizar selectivamente multímeros de adiponectina.

Se ha descrito un método para analizar la adiponectina contenida en una muestra sin tratamiento desnaturizante con SDS ni tratamiento de desnaturización térmica (Documento de Patente 1, se describe en el documento que se midió la adiponectina nativa). Sin embargo, no se ha hecho referencia al análisis selectivo, y este método no puede
60 ser empleado para el análisis selectivo.

[Documento de Patente 1] Documento WO 03/016906
 [Documento de Patente 2] Documento JP-A-2002-363094
 5 [Documento de Patente 3] Documento JP-A-2000-304748
 [Documento No de Patente 1] Yamauchi T., et al., Nat. Med., 7, 941-946, 2001
 [Documento No de Patente 2] Nakano Y., et al., J. Biochem., 120, 803-812, 1996
 [Documento No de Patente 3] Tsao TS., Et al., J. Biol. Chem., 277, 29359-29362, 2002
 [Documento No de Patente 4] Pojvani, et al., J. Biol. Chem., 278, 9073-9085, 2003
 10 [Documento No de Patente 5] Yamamoto Y., et al., Clin. Ciencia., 103, 137-142, 2002

Descripción de la Invención

Problemas a Resolver por la Invención

15 La presente invención proporciona un método para analizar selectivamente un multímero de adiponectina diana seleccionado entre adiponectina peso molecular medio (Ad PMM) o adiponectina de peso molecular ultrabajo (Ad PMUB) en una muestra biológica. Se describe un método para evaluar con precisión la relación entre una enfermedad y la adiponectina a través del análisis selectivo de los multímeros de adiponectina. El análisis selectivo
 20 proporciona una información que no puede obtenerse a través de la medición solo de la cantidad total de adiponectina.

Medios para Resolver el Problema

25 Con el fin de resolver los problemas, los autores de la presente invención han realizado extensos estudios y han encontrado que la sangre contiene adiponectina que puede ser clasificada en los siguientes tres tipos sobre la base del peso molecular medido mediante cromatografía de filtración en gel; 150 kDa o más y 200 kDa o menos (principalmente cerca de 160 kDa) (denominada en lo sucesivo Ad PMB), más de 200 kDa y menos de 400 kDa (principalmente cerca de 260 kDa) (denominada en lo sucesivo Ad PMM), y 400 kDa o más y 800 kDa o menos
 30 (principalmente cerca de 450 kDa) (denominada en lo sucesivo Ad PMA). Los autores de la presente invención han realizado estudios adicionales, y finalmente tuvieron éxito en la obtención de cuatro tipos de productos separados y purificados de multímeros de adiponectina de la sangre humana. Estos cuatro tipos pueden ser separados a través de electroforesis en poliacrilamida (2 a 15%) (en adelante puede ser referida como "PAGE (2 a 15%)") en condiciones no desnaturalizantes, y se definen como Ad PMUB, Ad PMB, Ad PMM y Ad PMA, de alta movilidad a
 35 baja movilidad. De estos cuatro tipos de adiponectina, se encontró que Ad PMB, Ad PMM y Ad PMA corresponden a los tres tipos de adiponectina anteriores contenidos en el suero. Además, los autores de la presente invención han encontrado que Ad PMB es un trímero adiponectina al que está unido la albúmina a través de un enlace disulfuro, y que, mediante el uso combinado de al menos un anticuerpo anti-adiponectina y un anticuerpo anti-albúmina, se puede analizar selectivamente la Ad PMB. Además, los autores de la presente invención han encontrado que, a
 40 través del cálculo del peso molecular con electroforesis de SDS-poliacrilamida (2 a 15%) (en adelante se puede denominar "SDS-PAGE") después del entrecruzamiento intramolecular, se determina que la Ad PMUB es un trímero de adiponectina, se deduce que la Ad PMM es un hexámero o nonámero, y se deduce que la Ad PMA es un multímero formado de monómeros cuyo número es el doble o más que de los monómeros que forman la Ad PMM.

45 Basándose en estos descubrimientos, los autores de la presente invención han encontrado que, a través de reacción de una proteasa adecuada con una muestra que contiene adiponectina, se puede digerir adiponectina distinta de Ad PMA, y que la Ad PMA que permanece después de la digestión con la proteasa se puede analizar selectivamente a través del uso de un anticuerpo anti-adiponectina.

50 Los autores de la presente invención también han encontrado que se puede determinar la cantidad de Ad PMM contenida en una muestra a través del tratamiento de la Ad PMUB y la Ad PMB con proteasa, el cálculo de la cantidad total de Ad PMA y Ad PMM que queda, y la resta de la cantidad de Ad PMA de la cantidad total de Ad PMA y Ad PMM, y que se puede determinar la cantidad de Ad PMUB contenida en una muestra a través del tratamiento de la Ad PMUB y la Ad PMB con proteasa, el cálculo de la cantidad total de Ad PMA y Ad PMM que queda, y la resta
 55 de la cantidad total de Ad PMA y Ad PMM y la cantidad de Ad PMB a partir de la cantidad total de adiponectina, que se ha determinado selectivamente. La presente invención se ha logrado sobre la base de los descubrimientos.

De este modo, la presente invención proporciona un método para analizar selectivamente un multímero de adiponectina diana en una muestra biológica, que comprende una etapa para distinguir el multímero de adiponectina
 60 diana de los otros multímeros de adiponectina mediante el uso de una proteasa y/o un anticuerpo para el análisis inmunológico como se define mediante la reivindicación 1. El multímero de adiponectina derivado de sangre humana tiene los siguientes cuatro tipos de adiponectina, y uno o dos de los cuatro tipos de adiponectina se seleccionan a partir de la adiponectina total y se someten a inmunoanálisis, mediante el uso de una proteasa y/o un anticuerpo;

1. (1) Ad PMUB: exhibe la mayor movilidad entre las cuatro principales bandas teñidas detectadas cuando la adiponectina que se ha purificado a partir de plasma humano o suero humano se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida (2 a 15%) en condiciones no desnaturalizantes, y tiene un peso molecular de alrededor de 100 kDa, medido a través de SDS-PAGE después del entrecruzamiento intramolecular;
- 5 2. (2) Ad PMB: exhibe la segunda mayor movilidad, a continuación de la Ad PMUB, entre las cuatro principales bandas teñidas detectadas cuando la adiponectina que se ha purificado a partir de plasma humano o suero humano se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida (2 a 15%) en condiciones no desnaturalizantes, tiene un peso molecular de alrededor de 150 kDa, medido a través de SDS-PAGE después del entrecruzamiento intramolecular, y se une a la albúmina a través de un enlace disulfuro;
- 10 3. (3) Ad PMM: exhibe la tercera mayor movilidad, a continuación de la Ad PMB, entre las cuatro principales bandas teñidas detectadas cuando la adiponectina que se ha purificado a partir de plasma humano o suero humano se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida (2 a 15%) en condiciones no desnaturalizantes, y tiene un peso molecular alrededor de 250 kDa, medido a través de SDS-PAGE después del entrecruzamiento intramolecular; y
- 15 4. (4) Ad PMA: exhibe la menor movilidad entre las cuatro principales bandas teñidas detectadas cuando la adiponectina que se ha purificado a partir de plasma humano o suero humano se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida (2 a 15%) en condiciones no desnaturalizantes, y tiene un peso molecular de 300 kDa o superior, medido a través de SDS-PAGE después del entrecruzamiento intramolecular.

20 También se describe un método para evaluar una enfermedad o un estado patológico de un ser humano, caracterizado porque comprende el análisis selectivo de uno o dos de los cuatro tipos de adiponectina anteriores derivados de sangre humana a partir del resto de la adiponectina y el inmunoanálisis del multímero o los multímeros de adiponectina objetivo, a través el uso de una proteasa y/o un anticuerpo, y la obtención de la información acerca de la enfermedad o la estado patológico sobre la base de los resultados del análisis selectivo.

25 **Efectos de la Invención**

La presente invención permite analizar selectivamente Ad PMUB, y Ad PMM, y por lo tanto la evaluación precisa del efecto fisiológico de la adiponectina y la evaluación del comienzo, el diagnóstico, el desarrollo, el pronóstico, y el efecto terapéutico de las enfermedades y los estados patológicos, especialmente la diabetes tipo II, la enfermedad arteriosclerótica, la enfermedad renal, la enfermedad hepática, la obesidad y el síndrome metabólico.

Breve descripción de los dibujos

- 35 [Fig. 1] Cromatograma de filtración en gel de los multímeros de adiponectina en el Ejemplo 1.
 [Fig. 2] Los resultados de la tinción con CBB de Ad PMB, Ad PMM, o Ad PMA después de la PAGE (2 a 15%), en el Ejemplo 1.
 [Fig. 3] Los resultados de la tinción con CBB de Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA después de la SDS-PAGE (2 a 15%), en el Ejemplo 2.
 40 [Fig. 4] Los resultados del análisis de Transferencia Western de la adiponectina sérica humana en el Ejemplo 5.
 [Fig. 5] Los resultados de inmunoanálisis de Ad PMB (adiponectina unida a albúmina) en el Ejemplo 6.
 [Fig. 6] Los resultados de tinción con CBB de los productos purificados de origen humano de Ad PMUB, Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA después de la PAGE (2 a 15%), en el Ejemplo 3.
 45 [Fig. 7] Los resultados de la tinción con CBB de los productos purificados de origen humano de Ad PMUB, Ad PMB, Ad PMM, y Ad-APM, que se habían sometido a SDS-PAGE (2 a 15%) en condiciones no desnaturalizantes, en el Ejemplo 4.
 [Fig. 8] Los resultados de la Transferencia Western de los productos purificados de origen humano de Ad PMUB, Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA, que se habían sometido a entrecruzamiento intramolecular y SDS-PAGE (2 a 15%), en el ejemplo 4.
 50 [Fig. 9] Los resultados del inmunoanálisis de Ad PMB (adiponectina unida a albúmina) en el Ejemplo 7.
 [Fig. 10] Los resultados del Ejemplo 13, que muestra la especificidad de la proteasa K en la digestión de multímeros de adiponectina.
 55 [Fig. 11] Los resultados del Ejemplo 13, que muestra la especificidad de la proteasa A "Amano" sobre la digestión de multímeros de adiponectina.

Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención

60 No se impone ninguna limitación concreta en la muestra biológica que se va a emplear en la presente invención, siempre y cuando la muestra biológica contenga multímero de adiponectina. Los ejemplos de la muestra biológica incluyen fluidos corporales (por ejemplo, sangre, orina), extractos de tejidos, y sobrenadantes de caldo de cultivo de células derivadas de tejido obtenidas de un mamífero tal como un ser humano o un animal (por ejemplo, mono, cabra, oveja, conejo, ratón, rata, cobaya). Con el fin de evaluar con precisión efecto fisiológico de la adiponectina, o la enfermedad o los estados patológicos de un paciente, se prefiere la sangre (suero, plasma) como muestra

biológica. No se impone limitación concreta sobre el método de obtención de una muestra, siempre que el método no afecte adversamente a la adiponectina presente en la muestra en términos del análisis selectivo de la adiponectina. Dependiendo de los fines de la evaluación, se puede seleccionar un método adecuado para la obtención de una muestra. Por ejemplo, se pueden extraer una muestra de sangre humana de un ser humano en ayunas o después de la administración de un fármaco al ser humano.

Los ejemplos específicos del inmunoanálisis de acuerdo con la presente invención incluyen un método conocido como un ELISA (inmunoanálisis enzimático), CLEIA (inmunoanálisis enzimático quimioluminiscente), RIA (radioinmunoanálisis), y LTIA (inmunoanálisis turbidimétrico con látex). En el caso del ELISA, por ejemplo, se puede emplear cualquiera de los siguientes procedimientos. Específicamente, en un procedimiento, un anticuerpo que reconoce la adiponectina está inmovilizado en un portador insoluble, y un anticuerpo marcado con enzima que reconoce la albúmina se utiliza combinado con el portador. En otro procedimiento, un anticuerpo que reconoce un complejo de adiponectina-albúmina está inmovilizado en un portador insoluble, el complejo de adiponectina-albúmina es capturado por medio del uso del portador, y un anticuerpo marcado con enzima que reconoce la adiponectina o la albúmina se emplea combinado con el portador. Cada uno de los procedimientos de ensayo se describirá en detalle. Un anticuerpo que reconoce la adiponectina está inmovilizado en un portador insoluble, y el portador se pone en contacto y se mezcla con una muestra que contiene un complejo de adiponectina-albúmina, para capturar de ese modo el complejo de adiponectina-albúmina sobre el portador insoluble. Posteriormente, un anticuerpo marcado con enzima que reconoce la albúmina se pone en contacto y se mezcla con el portador, con lo que se forma un complejo de 3 componentes "portador insoluble" - "complejo de adiponectina-albúmina" - "anticuerpo marcado con enzima". Después de eso, la enzima que marca el anticuerpo se hace reaccionar con un sustrato adecuado de la enzima, y el cambio en la absorbancia atribuido al producto de reacción se mide ópticamente, con lo que el complejo de adiponectina-albúmina se puede analizar cualitativa o cuantitativamente. En el caso del LTIA, un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a un complejo de adiponectina-albúmina se lleva sobre un portador insoluble, y el portador se mezcla con el complejo de adiponectina-albúmina para provocar el entrecruzamiento (agregación) del portador insoluble a través del complejo de adiponectina-albúmina. La turbidez resultante se mide ópticamente, con lo que el complejo de adiponectina-albúmina se puede analizar cualitativa o cuantitativamente. Para una medición exacta, conveniente y rápida de un complejo de adiponectina-albúmina, se prefiere el LTIA.

El portador insoluble que se va a emplear en la presente invención puede ser un portador insoluble orgánico que se ha empleado en inmunoanálisis rutinario y que puede ser producido industrialmente a gran escala. En el ELISA, se prefiere una microplaca de 96 pocillos fabricada, por ejemplo, de poliestireno, que tiene excelente adsorbabilidad del anticuerpo y que es capaz de mantener la actividad biológica estable durante un largo período de tiempo. En el LTIA, se prefieren partículas de látex de poliestireno.

Se conocen diversos métodos para soportar un anticuerpo sobre un portador insoluble, y en la presente invención se puede emplear cualquiera de los métodos conocidos según se desee. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser soportado (sensibilizado) a través de la adsorción física de un anticuerpo sobre la superficie de un portador insoluble. Alternativamente, la superficie de un portador insoluble que tiene un grupo funcional se puede sensibilizar eficientemente con un anticuerpo a través de un método unión física o química conocido.

No se impone ninguna limitación concreta sobre las condiciones de reacción bajo las cuales se hacen reaccionar un anticuerpo soportado sobre un portador insoluble y/o un anticuerpo marcado con enzima con un complejo de adiponectina-albúmina, con tal que la reacción antígeno-anticuerpo se produzca bajo las condiciones de reacción. No se impone ninguna limitación concreta sobre la mezcla de reacción que contiene un complejo de adiponectina-albúmina, siempre y cuando la mezcla de reacción no afecte adversamente a la reacción antígeno-anticuerpo del complejo de adiponectina-albúmina. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede contener un componente tampón para ajustar el pH (por ejemplo, tampón fosfato, tampón glicina, tampón Tris, tampón de Good), cloruro sódico, un tensioactivo, o una sustancia similar para la prevención de reacciones no específicas, y un estabilizante tal como albúmina de suero bovino (BSA), sacarosa, o polímero de polisacárido, según se desee. La mezcla de reacción también puede contener, además de las sustancias mencionadas anteriormente, que controlan la reactividad, un polisacárido soluble en agua tal como el dextrano, o un aditivo tal como un inhibidor de la enzima, según sea apropiado.

Se puede preparar un anticuerpo marcado con enzima utilizado en el ELISA a través de un método conocido. Por ejemplo, a través del método de Ishikawa et al. (método de la maleimida: "Enzyme Immunoassay, 3ª edición", Igaku-Shoin Ltd.), se puede marcar con una enzima un anticuerpo no tratado o un anticuerpo que se ha sometido a la proteólisis limitada con una proteasa adecuada para formar F(ab')₂ o Fab' de acuerdo con las necesidades. Los ejemplos de la enzima para el marcaje incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina, β-D-galactosidasa, y glucosa oxidasa. La actividad enzimática se determina por medio de un sustrato, y, si fuera necesario, un agente de desarrollo de color. Cuando se emplea peroxidasa como enzima, se puede emplear peróxido de hidrógeno como sustrato, y se puede emplear o-fenilendiamina, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, sal de amonio de 2,2'-azinodi-(ácido 3-etilbenzotiazolinosulfónico), o una sustancia similar como agente de desarrollo de color. Cuando la enzima es

fosfatasa alcalina, se puede emplear como sustrato fosfato de p-nitrofenilo o una sustancia similar. Cuando la enzima es β -D-galactosidasa, se puede emplear como sustrato β -D-galactopiranosido o una sustancia similar. Cuando la enzima es glucosa oxidasa, en presencia de peroxidasa, se puede emplear β -D-glucosa como sustrato de la glucosa oxidasa, y se puede emplear un agente de desarrollo de color similar al empleado en el caso de la peroxidasa.

Cuando se realiza el ELISA, no se impone ninguna limitación concreta sobre el método para someter a ensayo un producto de reacción entre un sustrato y una enzima, sobre la base de la actividad enzimática del anticuerpo marcado con enzima. Por ejemplo, cuando la enzima, el sustrato, y el agente de desarrollo de color son peroxidasa, peróxido de hidrógeno, y o-fenilendiamina, respectivamente, el producto de la reacción enzimática se puede detectar mediante la determinación de la absorbancia a 492 nm, que es la longitud de onda característica del producto de reacción, mediante el uso de un lector de microplacas de 96 pocillos.

No se impone ninguna limitación concreta sobre el método para determinar el grado de agregación de los portadores insolubles en el LTIA. Por ejemplo, con el fin de evaluar cualitativa o semi-cuantitativamente la agregación, el grado de agregación se puede determinar visualmente mediante la comparación de la turbidez entre las muestras que tienen concentraciones conocidas y la muestra diana. Con el fin de evaluar cuantitativamente la agregación, preferiblemente, se emplea la medición óptica, desde el punto de vista de la conveniencia y la precisión. La medición óptica de masa agregada se puede realizar a través de un método conocido. Los ejemplos específicos de la medición óptica que se pueden emplear en la presente invención incluyen la denominada medición turbidimétrica (la formación de masa agregada se observa como un aumento de la turbidez), la medición del tamaño de partícula de distribución (la formación de masa agregada se observa como un cambio en la distribución del tamaño partícula o el tamaño medio de partícula), y el análisis turbidimétrico que integra esferas (el cambio en la radiación dispersada en la dirección delantera causada por la formación de masa agregada se mide mediante el uso de una esfera de integración, y se compara la razón entre la intensidad y la radiación transmitida).

Ahora se describirá un método para someter selectivamente a inmunoanálisis la Ad PMM. La cantidad de Ad PMM se puede determinar de la siguiente manera, esto es, una proteasa que digiere específicamente Ad PMUB y Ad PMB se hace reaccionar con una muestra; se determina la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA no digerida que queda; y la cantidad de Ad PMA se resta de la cantidad total. No se impone ninguna limitación concreta sobre la proteasa empleada en este método, con tal que la proteasa digiera específicamente solo Ad PMUB y Ad PMB. No se impone ninguna limitación concreta sobre el origen de la proteasa, y la proteasa es una derivada de un microorganismo, un animal, una planta, o similar. Una proteasa preferida es una derivada de un microorganismo que pertenece, por ejemplo, al género *Bacillus*, *Aspergillus* o *Staphylococcus*. Se puede emplear un producto disponible en el mercado, incluyendo la proteasa S "Amano" y la proteasa A "Amano" (productos de Amano Enzyme Inc.), sumizyme FP y sumizyme LP50D (productos de Shin Nihon Chemical Co., Ltd.), y la proteasa V8 (Seikagaku Corporation). La proteasa puede ser obtenida a través de la tecnología genética recombinante. La proteasa puede ser modificada químicamente. La cantidad de Ad PMM y Ad PMA que quedan se puede determinar mediante el uso de un kit disponible en el mercado para determinar la cantidad total de adiponectina. La cantidad de Ad PMA contenida en la muestra puede determinarse mediante el método descrito anteriormente.

El método para procesar una muestra biológica con proteasa difiere dependiendo del tipo de proteasa. Preferiblemente, el tratamiento con proteasa se lleva a cabo en un tampón tal como tampón fosfato, tampón Tris, o tampón de Good durante 5 minutos a 24 horas a 4 a 60°C. La concentración de la proteasa empleada para el tratamiento se determina considerando la actividad específica de la proteasa, la temperatura de reacción, el tiempo de reacción, y factores similares. Típicamente, la proteasa se emplea a una concentración que se encuentra dentro del intervalo de 0,01 a 100 U/ml o 0,01 a 100 mg/ml. El inmunoanálisis puede realizarse a través de ELISA o LTIA con referencia a las descripciones anteriores sobre el inmunoanálisis selectivo de Ad PMB.

Alternativamente, la cantidad de Ad PMM se puede determinar de la manera siguiente, es decir, la cantidad total de Ad PMUB, Ad PMB, y Ad PMM se determina como la cantidad total de adiponectina convertida a través del uso de una proteasa descrita anteriormente en relación al análisis selectivo de Ad PMA, y la cantidad total de Ad PMUB y Ad PMB convertidas, que se ha determinado a través del uso de la proteasa anterior que digiere específicamente Ad PMUB y Ad PMB, se resta de la cantidad total anterior de Ad PMUB, Ad PMB, y Ad PMM. El inmunoanálisis puede realizarse a través de ELISA o LTIA con referencia a las descripciones anteriores a cerca del inmunoanálisis selectivo de Ad PMB o Ad HIKW.

Ahora se describirá un método para someter a inmunoanálisis selectivo la Ad PMUB. La cantidad de Ad PMUB se puede determinar a través de la resta, de la cantidad total de adiponectina, de la cantidad total de Ad PMB, Ad PMM y Ad PMA determinada anteriormente. En concreto, se hace reaccionar una proteasa que digiere específicamente Ad PMUB y Ad PMB, se determina la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA que quedan, y la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA y la cantidad de Ad PMB se restan de la cantidad total de adiponectina, que ha sido determinada por separado.

Cada uno de los cuatro tipos de adiponectina humana presentes en una muestra de sangre humana se puede analizar selectivamente. Por lo tanto, la presente invención permite la evaluación del comienzo, la diagnosis, el desarrollo, el pronóstico y el efecto terapéutico de la diabetes de tipo II, la enfermedad arteriosclerótica, la enfermedad renal, la enfermedad hepática, la obesidad y el síndrome metabólico. Por ejemplo, la evaluación puede realizarse mediante la observación del cambio en una o más de las cantidades de Ad PMUB y Ad PMM, o la observación de la proporción de al menos dos de la cantidad total de adiponectina, la cantidad de Ad PMUB, y la cantidad de Ad PMM, y la comparación de los resultados con un valor estándar. Alternativamente, la evaluación se puede realizar a través de la observación del cambio en el tiempo de estas cantidades en el mismo individuo. Alternativamente, la evaluación puede realizarse mediante la correlación de un índice conocido que se ha utilizado para una determinada enfermedad o estado patológico (por ejemplo, la insulina en la diabetes tipo II, o el colesterol HDL en la enfermedad arteriosclerótica, o similares) con al menos una de las cantidades de Ad PMUB y Ad PMM o con la proporción de al menos dos de las cantidades de la cantidad total de la adiponectina, la cantidad de Ad PMUB, y la cantidad de MMW-AD.

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación en detalle por medio de ejemplos, que no se deben considerar limitantes de la invención.

<Reactivos y materiales>

Los reactivos y materiales empleados en los Ejemplos y Ejemplos de Referencia son;

- a. líquido de lavado de resina de unión a anticuerpo: NaHCO_3 -NaOH 0,1 M (pH 8,3) que contiene NaCl 0,5 M;
- b. eluyente de resina de unión a anticuerpo: glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5);
- c. líquido de neutralización de resina de unión anticuerpo: Tris-HCl 2M (pH 8,0);
- d. Placa de ELISA: microplaca de 96 pocillos (producto de NUNC);
- e. Solución de sensibilización de anticuerpos de ELISA: PBS (pH 7,4);
- f. Tampón de ELISA: PBS (pH 7,4) que contiene albúmina de suero bovino al 1% y Tween 20 al 0,1%;
- g. Kit Vector ABC (ratón): producto de Funakoshi Co., Ltd., Núm. de Cat PK-6102;
- h. Kit de sustrato DAB (sustrato para desarrollo del color en la transferencia Western): producto de Funakoshi Co., Ltd., Núm. de Cat SK-4100;
- i. anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana (AcMo hu-Acrp30): producto de Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., BD Transduction Laboratories, código de producto: A12820;
- j. anticuerpo policlonal de cabra anti-adiponectina humana (anticuerpo Goat α human Acrp30): producto de Cosmo Bio Co., Ltd., GT, Núm. de Cat 421065;
- k. anticuerpo de cabra marcado con HRP anti-IgG de ratón: Cosmo Bio Co., Ltd., producto de Capple;
- l. líquido de lavado de ELISA: PBS que contiene Tween 20 0,05%;
- m. Tampón de ELISA 2: PBS que contiene BSA al 1% y Tween 20 al 0,05%;
- n. anticuerpo policlonal de cabra marcado con HRP anti-albúmina humana (anticuerpo HRP-Gt anti-HSA): producto de PARIS, y
- o. HRP-Avidina: producto de PIERCE.

Ejemplo de Referencia 1. Preparación de adiponectina globular de ratón recombinante en E. coli (rMgAd)

La secuencia del dominio globular (correspondiente a los residuos 104-247) de la secuencia del gen de la adiponectina de ratón (acceso NCBI Núm. U37222) se insertó en BamHI y HindIII de un vector pQE30 que contenía la etiqueta 6 x His, y a continuación se introdujo en E. coli. La adiponectina globular ratón recombinante (rMgAd) expresada en E. coli se purificó mediante el siguiente proceso. Específicamente, una fracción soluble de E. coli se añadió a Ni-NTA agarosa (producto de QIAGEN), y se hizo que rMgAd se uniera durante 16 horas a 4°C. La rMgAd se hizo eluir seriamente con imidazol, y una fracción que contenía adiponectina se recogió y se dializó con PBS (pH 7,4) durante tres días. El contenido de proteína de la rMgAd resultante se determinó por medio de un kit de análisis de proteínas Bio-Rad DC.

Ejemplo de Referencia 2. Producción de anticuerpo anti-rMgAd

El rMgAd (50 g) preparado en el Ejemplo de Referencia 1 y la misma cantidad de coadyuvante completo de Freund se mezclaron, y se inmunizaron dos conejos con la mezcla seis veces, a intervalos de dos semanas, para producir un antisuero. El anticuerpo específico (IgG) presente en el antisuero se purificó a través de un método rutinario por medio del uso de resina con proteína A (anticuerpo anti-rMgAd).

Ejemplo de Referencia 3. Purificación del multímero de adiponectina (mAd) derivado de sangre humana

El anticuerpo anti-rMgAd (500 mg) preparado en el Ejemplo de Referencia 2 se unió a Sefarosa 4B activada con CNBr (Amersham Bioscience) (50 ml), para preparar de ese modo resina Sefarosa 4B de unión a anticuerpo anti-rMgAd. Se añadió suero humano (2,5 L) a la resina Sefarosa 4B de unión a anticuerpo anti-rMgAd, y la resina se lavó cuidadosamente con el líquido de lavado de la resina de unión al anticuerpo. Se aplicó el eluyente de la resina de unión al anticuerpo para obtener una fracción de adiponectina sérica humana (mAd), y el líquido de neutralización de la resina de unión al anticuerpo se añadió a la fracción para la neutralización en una cantidad de 1/10 de la fracción. Después de eso, la fracción neutralizada se aplicó a la resina de Proteína A, y se recogió una fracción que contenía los componentes que no se adsorben a la resina de Proteína A como Acm purificado. El contenido de adiponectina se determinó por medio de un "kit ELISA de adiponectina humana" (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

Ejemplo de Referencia 4. Producción de anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana

El Acm purificado (20 mg) obtenido en el Ejemplo de Referencia 3 se mezcló con la misma cantidad de coadyuvante completo de Freund, y se inmunizaron dos ratones con la mezcla tres o cuatro veces, a intervalos de dos semanas. La mezcla se administró a los ratones de nuevo tres días antes de la fusión celular. Las células del bazo se recogieron de los ratones inmunizados, y se realizó la fusión celular con células de mieloma P3U1 a través de un método rutinario mediante el uso de polietilenglicol. Las células fusionadas que producen anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana se seleccionaron a través de un método conocido. Específicamente, se seleccionaron los pocillos que fueron altamente reactivos con el Acm a través de ELISA, y se realizó la dilución limitante. Las células fusionadas seleccionadas se administraron por vía intraperitoneal a ratones que habían sido tratados con pristano, y la ascitis se recogió en forma de anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humano. La purificación del anticuerpo específico (IgG) a partir de la ascitis se realizó mediante un método rutinario mediante el uso de resina de proteína A. De este modo, se obtuvieron las células fusionadas que producen once anticuerpos monoclonales anti-adiponectina humana así como tales anticuerpos monoclonales (números de identificación 64401 a 64411).

Ejemplo 1 Separación y purificación de multímeros de adiponectina derivados de la sangre humana (1)

El Acm purificado obtenido en el Ejemplo de Referencia 3 se desmineralizó mediante diálisis con tampón fosfato 20 mM (pH 7,0), adsorbido a una columna de Gelatina-Cellulofine (Seikagaku Corporation), y a continuación se hizo eluir seriadamente con tampones de fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenían NaCl 0, 100, 200, 300, y 500 mM. Las fracciones del producto eluido resultantes, que habían sido obtenidas mediante el uso de los tampones de diferente concentración de NaCl, contenían mezclas de adiponectina de diferentes pesos moleculares. Cada una de las fracciones del producto eluido se concentró y a continuación se sometió a cromatografía de filtración en gel a través del uso de Sephacryl S-300 (peso molecular fraccionado; 10 a 1500 kDa, tamaño medio de partícula; 47 µm, Amersham Bioscience). En la cromatografía de filtración en gel, se empleó como eluyente tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 150 mM. La calibración del peso molecular de la columna Sephacryl S-300 había sido realizado mediante el uso de un Kit de calibración de filtración en gel (Amersham Bioscience). En la cromatografía, la adiponectina se detectó por medio de un "kit de ELISA de adiponectina humana" (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

La Fig. 1 muestra el cromatograma de filtración en gel. Las fracciones del producto eluido se dividieron en tres porciones, es decir, 150 kDa o más y 200 kDa o menos (en su mayoría cerca de 160 kDa), más de 200 kDa y menos de 400 kDa (en su mayoría cerca de 260 kDa), y 400 kDa o más y 800 kDa o menos (en su mayoría cerca de 450 kDa), para preparar así el multímero de adiponectina separado y productos purificados. Un primer producto de 150 kDa o más y 200 kDa o menos (en su mayoría cerca de 160 kDa) es referido como Ad PMB, un segundo producto de más de 200 kDa y menos de 400 kDa (en su mayoría cerca de 260 kDa), es referido como Ad PMM, y un tercer producto de 400 kDa o más y 800 kDa o menos (en su mayoría cerca de 450 kDa), es referido como Ad PMA.

Cada uno de los tres multímeros de adiponectina separados preparados anteriormente y los productos purificados, es decir, Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (concentración de poliacrilamida: 2 a 15%) (denominada en lo sucesivo PAGE (2 a 15%)) para la separación y a continuación a tinción de proteínas con CBB (Azul Brillante de Coomassie). La Fig. 2 muestra los resultados de la tinción de las proteínas sometidas a electroforesis.

En cada una de Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA, se observaron bandas distintas a la banda principal teñida pero se detectaron con una claridad considerablemente menor en comparación con la banda principal, revelando que la separación y purificación se completaron satisfactoriamente. Puesto que los multímeros de adiponectina se forman basándose en un trímero como se describió anteriormente, el peso molecular de cada una de Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA medido a través PAGE no coincide necesariamente con el medido a través de filtración en gel.

Ejemplo 2 Análisis de la Estructura de los multímeros de adiponectina (Ad PMB, Ad PMM y Ad PMA) derivados de sangre humana

1) Análisis con SDS-PAGE

Cada uno de los multímeros de adiponectina separados y productos purificados obtenidos en el Ejemplo 1 se sometió a SDS-PAGE (2 a 15%) en condiciones no reductoras para la separación y a continuación a tinción de proteínas con CBB. La Fig. 3 muestra los resultados de la tinción de las proteínas sometidas a electroforesis.

En cada una de Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA, se observó una banda clara teñida en la proximidad de 60 kDa. Se dedujo que la banda teñida era un dímero adiponectina sobre la base de la estructura y peso molecular referidos de la adiponectina. En la Ad PMB, además de la banda próxima de 60 kDa, se observó una banda clara, teñida no identificada en la proximidad de 90 kDa.

2) Análisis de la adiponectina no identificada correspondiente a la banda próxima a 90 kDa en SDS-PAGE (2 a 15%)

Una porción de gel que contenía la banda no identificada teñida próxima a 90 kDa, que habían sido detectada en el apartado 1) anterior, se cortó, y la proteína se extrajo por medio de un electroeluidor Modelo 422 (producto de Bio-Rad Laboratories, Inc.). La proteína extraída se hirvió y redujo mediante el uso de una solución de tratamiento que contenía 2-mercaptoetanol, y el producto se sometió a SDS-PAGE (2 a 15%) para la separación y a continuación se transfirió a una membrana de PVDF, seguido de tinción de proteínas con CBB. Se observaron dos bandas teñidas en la proximidad de 60 kDa y 30 kDa.

Las proteínas que muestran las bandas próximas a 60 kDa y 30 kDa se analizaron en términos de la secuencia de aminoácidos N-terminal. Se encontró que la secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína de la banda próxima a 60 kDa coincidía con la secuencia de aminoácidos N-terminal de la albúmina humana. Se encontró que la secuencia de aminoácidos N-terminal de la proteína de la banda próxima a 30 kDa coincidía con una porción de la secuencia de aminoácidos de la adiponectina que comienza en el residuo de aminoácido 19^a.

De los resultados descritos anteriormente, se encontró que la proteína correspondiente a la banda próxima a 90 kDa, que se detecta cuando Ad PMB se somete a SDS-PAGE (2 a 15%), era un heterodímero formado a través de la unión disulfuro del monómero de albúmina y el monómero de adiponectina. Por lo tanto, se encontró que la adiponectina contenida en la fracción Ad PMB tenía una estructura en la que el trímero adiponectina y la albúmina se unen entre sí a través de una unión disulfuro.

Ejemplo 3 Separación y purificación de multímeros de adiponectina derivados de sangre humana (2)

El Acm purificado se preparó también de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo de Referencia 3, se desmineralizó a través de diálisis con tampón fosfato 20 mM (pH 7,0), se adsorbió a una columna de Gelatina-Cellulofine (Seikagaku Corporation), y a continuación se hizo eluir seriadamente con cada uno de tampones de fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenía, NaCl 0, 100, 200, y 500 mM. Se encontró que la fracción resultante eluida con NaCl 100 mM contenía Ad PMUB, Ad PMB, y Ad PMM, y se encontró que la fracción eluida con NaCl 200 mM contenía Ad PMM y Ad PMA. Sin embargo, se encontró que la fracción eluida con NaCl 500 mM contenía solamente Ad PMA. Por lo tanto, la fracción eluida con NaCl 500 mM se empleó en la siguiente etapa como Ad PMA separada y producto purificado. Posteriormente, se preparó una resina de Sefarosa 4B de unión al anticuerpo para ALB α humana de cabra a acuerdo con el método descrito en el Ejemplo de Referencia 3, y la fracción eluida con NaCl 100 se aplicó a la resina, para obtener de ese modo una fracción no adsorbida y una fracción adsorbida. Se encontró que la fracción no adsorbida contenía Ad PMUB y Ad PMM, pero se encontró que la fracción adsorbida contenía solamente Ad PMB. Por lo tanto, la fracción adsorbida se empleó en la siguiente etapa como la fracción Ad PMB. Después de eso, la fracción no adsorbida se concentró y se sometió a continuación a cromatografía de filtración en gel mediante el uso de Sephacryl S-300 (peso molecular fraccionado, de 10 a 1.500 kDa, tamaño medio de partícula; 47 μ m, Amersham Bioscience), para separar de ese modo la Ad PMUB de la Ad PMM. Las fracciones resultantes se emplearon en la siguiente etapa como Ad PMUB separada y producto purificado y Ad PMM separada y producto purificado, respectivamente.

La separación y purificación en este Ejemplo se realizó sobre la base de la información obtenida en la separación y purificación en el Ejemplo 1, mientras que las condiciones de separación y purificación se modificaron. Como resultado, en este método, se aisló un nuevo tipo de adiponectina (denominada en lo sucesivo Ad PMUB) además de los tres tipos Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA.

Los cuatro tipos de multímeros de adiponectina separados y los productos purificados, es decir, Ad PMUB, Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA, se separaron entre sí a través de PAGE (2 a 15%) en condiciones no desnaturizantes, seguido por tinción de proteínas con CBB. La Fig. 6 muestra los resultados de la tinción de las proteínas sometidas a electroforesis.

Ejemplo 4 Análisis de la estructura de multímeros de adiponectina (Ad PMUB, Ad PMB, Ad PMM y Ad PMA) derivados de sangre humana

1) Análisis con SDS-PAGE

Cada uno de los multímeros de adiponectina separados y los productos purificados obtenidos en el Ejemplo 3 se sometieron a SDS-PAGE (2 a 15%) en condiciones no reductoras para la separación y a continuación a tinción de la proteína con CBB. La Fig. 7 muestra los resultados de la tinción de las proteínas sometidas a electroforesis.

En cada una de Ad PMUB, Ad PMB, Ad PMM, y Ad PMA, se observó una banda de tinción clara en la proximidad de 60 kDa. Se dedujo que la banda teñida era un dímero adiponectina sobre la base de la estructura y el peso molecular referidos de la adiponectina. En la Ad PMB, además de la banda próxima a 60 kDa, se observó una banda teñida clara, no identificada en la proximidad de 90 kDa. En la Ad PMUB, puesto que se observó una banda teñida atribuida al monómero además de la banda teñida atribuida al dímero, se dedujo que Ad PMUB era un trímero. En la Fig. 7, se observaron dos bandas teñidas atribuidas a Ad PMB. Se confirmó por separado que las dos bandas correspondían a la adiponectina que se une a albúmina.

2) Estimación del peso molecular a través de entrecruzamiento intramolecular

Cada uno de los multímeros de adiponectina separados y los productos purificados obtenidos en el Ejemplo 3 se diluyeron con tampón de fosfato 100 mM (pH 8,0) hasta aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/mL. Un agente de entrecruzamiento, suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (nombre comercial BS³: Producto de Pierce), se diluyó con agua purificada a 20 mg/ml. Se mezclaron cantidades iguales del producto diluido y del agente del entrecruzamiento diluido y luego se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió a la mezcla la misma cantidad de Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), y la mezcla resultante se dejó en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente. El líquido resultante se sometió a SDS-PAGE (2 a 15%) en condiciones no reductoras para la separación, se transfirió a una membrana de PVDF a través de transferencia semi-seca secante y, a continuación se sometió a inmunotinción. Específicamente, una membrana de transferencia se bloqueó con PBS que contenía de leche desnatada al 5% y NaN₃ al 0,1%, se lavó con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%, y a continuación se hizo reaccionar con un anticuerpo monoclonal anti- adiponectina humana (hu Acrp30-MoAb) (1 µg/mL) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó cuidadosamente con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%, y se dejó que se desarrollara color se mediante el uso de un kit Vector ABC (ratón) y un kit de sustrato DAB.

Los resultados se muestran en la Fig. 8. La calibración peso molecular se realizó mediante el uso de un marcador de peso molecular. La Ad PMUB proporciona una banda teñida próxima a aproximadamente 100 kDa y se identificó como un trímero sobre la base de la estructura referida anteriormente y el peso molecular de la adiponectina. La Ad PMB proporciona una banda teñida próxima a aproximadamente 150 kDa y se identificó como un trímero de unión a albúmina similar al obtenido anteriormente, sobre la base del peso molecular. La Ad PMM proporciona una banda teñida próxima a 250 kDa y se dedujo que era un hexámero o un nanómetro. La Ad PMA proporciona una banda teñida a un peso molecular considerablemente alto, y se dedujo que tenía un peso molecular muy alto, de al menos 300 kDa o superior, y que era un 12-mero o 18-mero aproximadamente. Sin embargo, la forma exacta de Ad PMA permanece sin identificar.

Ejemplo 5 Análisis de transferencia Western de la adiponectina contenida en suero humano

Las muestras de suero (0,2 l) obtenidas a partir de ocho sujetos sanos se sometieron a PAGE (2 a 15%) para la separación, se transfirieron a una membrana de PVDF a través de transferencia semi-seca, y se sometieron a inmunotinción. Específicamente, una membrana de transferencia se bloqueó con PBS (pH 7,4) que contenía de leche desnatada al 5% y NaN₃ al 0,1%, se lavó con PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,1%, y después se hizo reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-adiponectina (hu-Acrp30 MoAb; Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., BD Transduction Laboratories) (1 µg/mL). La membrana se lavó cuidadosamente con PBS (pH 7,4) que contenía Tween 20 al 0,1%, y se dejó que se desarrollara el color mediante el uso de un kit Vector ABC (Ratón) y un kit de sustrato DAB (Funakoshi Co., Ltd.).

Como resultado, las bandas principales se observaron en posiciones similares a las de las fracciones de Ad PMB, Ad PMM, y Ad HMW preparadas en el Ejemplo 1, revelando que la sangre contiene predominantemente estos tres tipos de adiponectina (Fig. 4).

La Ad PMUB no ofrece sustancialmente ninguna banda teñida. Aunque la razón de esto todavía no se ha aclarado, se postula que la cantidad de Ad PMUB presente en la sangre era pequeña (Fig. 4).

Ejemplo 6 Análisis de adiponectina de unión a albúmina (1)

Un anticuerpo policlonal de cabra anti-adiponectina humana (anticuerpo Acrp30 para α humana de cabra) se diluyó con una solución de sensibilización de anticuerpos para ELISA a 1 mg/mL, y una placa de ELISA se sensibilizó con el producto diluido. La placa se bloqueó con un tampón de ELISA. La Ad PMB preparada en el Ejemplo 1 se diluyó con un tampón de ELISA a 1, 0,1, y 0,01 μ g/mL (contenido de Ad) y después se hizo reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó con un tampón de ELISA. Un líquido con anticuerpo monoclonal anti-albúmina humana (Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública (*kokai*) Núm 2001-337092) que se había diluido 2000 veces con un tampón de ELISA se hizo reaccionar con la placa de ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó con un tampón de ELISA. Un líquido con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Cabra α ratón) marcado con HRP que se había diluido 1000 veces con un tampón de ELISA se hizo reaccionar con la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó con un tampón de ELISA. La HRP desarrolló color a través de la reacción de la enzima con los sustratos, es decir, TMB (tetrametilbenzidina) y peróxido de hidrógeno. Se añadió ácido sulfúrico 2N a la mezcla de reacción para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados de la medición se muestran en la Figura. 5.

Se observó un aumento en la absorbancia dependiente de la concentración, lo que indica que el inmunoanálisis sándwich estaba justificado. Por lo tanto, se confirma que la Ad PMB es adiponectina que se une a la albúmina (adiponectina de unión a albúmina). Además, se encontró que el método del presente ejemplo posibilita el análisis selectivo de Ad PMB.

Ejemplo 7 Análisis de adiponectina de unión a albúmina (2)**(1) Linealidad en la dilución**

Una placa de ELISA se sensibilizó con un anticuerpo monoclonal anti-adiponectina (64402), que había sido diluido con una solución de sensibilización de anticuerpos de ELISA a 5 μ g/ml. Con posterioridad, la placa se bloqueó con un tampón de ELISA que contenía suero de cabra al 20%. El producto purificado de Ad PMB preparado en el Ejemplo 3 se diluyó con un tampón de ELISA a 0 a 20 ng/ml (contenido de Ad), y a continuación se hizo reaccionar con la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó con un líquido de lavado de ELISA, y después se hizo reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti-albúmina humana marcado con HRP (HRP-Gt anti-HSA) que se había diluido 1000 veces con un tampón de ELISA. La placa se lavó con un líquido de lavado de ELISA y a continuación se desarrolló color con un líquido de desarrollo de color OPD (tampón citrato 250 mM que contenía 2 mg/ml de hidrocloreuro de ortofenilendiamina y de peróxido de hidrógeno al 0,02%, pH 5,0). Se añadió un líquido de parada (ácido sulfúrico 1,5 N, EDTA-2Na 1 mM) a la placa para detener la reacción, y se midió la absorbancia a 492 nm. Los resultados del ensayo se muestra en la Fig. 9.

Se observó un aumento en la absorbancia dependiente de la concentración, lo que indica que el inmunoanálisis sándwich estaba justificado. Por lo tanto, se confirma que la Ad PMB es adiponectina que se une a la albúmina (adiponectina de unión a albúmina).

(2) Ensayo de adición-recuperación

Se diluyó suero humano 100 a 800 veces con un tampón 2 de ELISA, y el producto purificado de Ad PMB preparado en el Ejemplo 3 (0 a 50 ng/ml) se añadió al producto diluido. La mezcla se analizó con un sistema ELISA similar al del apartado (1), y el porcentaje de recuperación se determinó sobre la base de la cantidad añadida y la cantidad medida. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Factor de dilución del suero	Cantidad de Ad purificada añadida (ng/ml) →	10	5	2.5	1,25	0
100	Calculada (ng/ml)	13,75	8,75	6,25	5,00	3,75
	Encontrada (ng/ml)	15,22	9,78	6,48	5,08	3,75
	Recuperación (%)	111	112	104	102	100
200	Calculado (ng/ml)	11,97	6.97-	4,47	3,22	1,97
	Encontrado (ng/ml)	12,13	7,13	4,42	3,31	1,97
	Recuperación (%)	101	102	99	103	100
400	Calculada (ng/ml)	11,00	6,00	3,50	2,25	1,00
	Encontrada (ng/ml)	11,72	6,02	3,60	2,35	1,00
	Recuperación (%)	106,5	100,4	102,7	104,6	100,0
800	Calculada (ng/ml)	10,53	5,53	3,03	1,78	0,53
	Encontrada (hg/ml)	10,83	5,44	3,07	1,81	0,53
	Recuperación (%)	103	98	101	102	100

En todos los casos, se obtuvo un buen porcentaje de recuperación, revelando que el método de la presente Ejemplo permite analizar selectivamente la Ad PMB.

Ejemplo 8 Tratamiento con proteasa (1)

El Acm purificado preparado en el Ejemplo de Referencia 3 y cada proteasa asequible comercialmente se añadieron a tampón fosfato 50 mM (pH 8,0), y la mezcla se calentó durante 60 minutos a 37°C. El líquido de tratamiento se sometió a PAGE (2 a 15%) para la separación y se tiñó con CBB. De este modo, la acción de cada proteasa sobre cada una de las fracciones se comparó con la del control al que no se añadió proteasa (Tabla 2).

A través de tratamiento con proteasa bajo cualquiera de las condiciones 1 y 2, la fracción correspondiente a la Ad PMB desapareció, mientras que la Ad PMM y la Ad PMA permanecieron presentes. No se observó ningún producto obvio convertido. A través de tratamiento con proteasa bajo cualquiera de las condiciones 3 y 4, no se observó Ad PMB, mientras que Ad PMM y Ad PMA estuvieron presentes. En este caso, se observó una nueva banda teñida atribuida a un producto convertido derivado de Ad PMB en una región de bajo peso molecular. A través de su tratamiento con proteasa en cualquiera de las condiciones 5 y 6, la Ad PMB y la Ad PMM desaparecieron, mientras que APM-Ad permaneció presente. En este caso, se observó una nueva banda teñida atribuida a un producto convertido derivado de Ad PMB en una región de bajo peso molecular. Las regiones en las que estos productos convertidos fueron detectados mediante PAGE (2 a 15%) estaban comprendidas en el rango de 3,0-42 kDa; los valores exactos pueden variar dependiendo del tipo de proteasa. Estos resultados indican que la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA se puede determinar a través del tratamiento en las condiciones 1 o 2; la cantidad sólo de Ad PMB o la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA se puede determinar a través del tratamiento en las condiciones 3 o 4, y la cantidad de Ad PMM o la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA se puede determinar a través del tratamiento en las condiciones 5 o 6.

[Tabla 2]

Condiciones de tratamiento	1	2	3	4	5	6
Proteasa	Proteasa S "Amano"	proteasa V8	Proteasa A "Amano"	Sumizyme FP	Proteasa P "Amano"	Umamizyme
Multímero de adiponectina						
Ad PMA	+	+	+	+	+	+
Ad PMM	+	+	+	+	-	-
Ad PMB	-	-	-	-	-	-
Producto Convertido	-	-	+	+	+	+
(-): Ausente, (+): Sin cambios, o producción de producto convertido						

Ejemplo 9 Tratamiento con proteasa (2)

- 5 El Acm purificado analizado en el Ejemplo 3 y cada proteasa disponible comercialmente (1 mg/ml) se añadieron a tampón fosfato 50 mM (pH 8,0), y la mezcla resultante se calentó durante 30 minutos a 37°C. El líquido de tratamiento se sometió a PAGE (2 a 15%) para la separación y se tiñó con CBB. Así, se comparó la acción de cada proteasa sobre cada una de las fracciones con la del control al que no se había añadido ninguna proteasa (Tabla 3).
- 10 A través del tratamiento con la proteasa en cualquiera de las condiciones 7 a 9, la Ad PMUB y la Ad PMB desapareció, mientras que la Ad PMM y la Ad PMA permanecieron presentes. En este caso, se observaron nuevas bandas teñidas atribuidas a los productos convertidos derivados de Ad PMUB y Ad PMB en las regiones de bajo peso molecular. A través de su tratamiento con la proteasa en cualquiera de las condiciones 10 a 12, la Ad PMUB, la Ad PMB y la Ad PMM desaparecieron, y la Ad PMA se mantuvo presente. En este caso, se observaron nuevas
- 15 bandas teñidas atribuidas a los productos convertidos derivados de Ad PMUB, Ad PMB, y Ad PMM en las regiones de bajo peso molecular. Las regiones en las que se detectaron estos productos convertidos a través de PAGE (2 a 15%) se situaron en el intervalo de aproximadamente 30-40 kDa; los valores exactos pueden variar dependiendo del tipo de proteasa. Estos resultados indican que la cantidad total de Ad PMUB y Ad PMB puede determinarse a través del análisis selectivo mediante el uso de cualquiera de las proteasas empleadas en las condiciones de tratamiento 7 a 9 y mediante la medición de la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA que quedan o la cantidad de nuevos productos de Ad convertidos. Además, la cantidad de Ad PMA que queda o la cantidad total de Ad PMUB, Ad PMB, y Ad PMM pueden determinarse a través del análisis selectivo mediante el uso de cualquiera de las proteasas empleadas en la
- 20 condiciones de tratamiento 10 a 12.

[Tabla 3]

Condiciones de Tratamiento	7	8	9	10	11	12
Proteasa	Proteasa A "Amano"	Sumizyme FP	Sumizyme LP50D	Proteinasa K	Proteasa P "Amano"	Proteasa N "Amano"
Múltimero de adiponectina						
Ad PMA	++	++	++	++	++	++
Ad PMM	++	++	++	-	-	-
Ad PMB	-	-	-	-	-	-
Ad PMUB	-	-	-	-	-	-
Producto convertido	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(+): Disminución, (++) Sin cambios, (+++): Aumento o producción de producto convertido
 (-): Ausente, o ninguna producción de producto convertido

Ejemplo 10 Tratamiento con proteasa para la realización del análisis de Ad PMA

- 5 Cada uno de los múltimeros de adiponectina separados y productos purificados obtenidos en el Ejemplo 3 se añadió a la fracción no adsorbente de resina del anticuerpo de unión obtenida en el Ejemplo de Referencia 3 (en lo sucesivo denominada "plasma con Ad eliminada") a una concentración final de 10 µg/ml más o menor, y la mezcla resultante se empleó como una muestra para la investigación. La proteinasa K se disolvió en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) para preparar una solución de 5-10 u/mL, y la solución se empleó como solución enzimática de pretratamiento. La solución enzimática de pretratamiento (90 µl) se añadió a cada una de las muestras (10 µl), y la mezcla se hizo reaccionar a 37°C durante períodos predeterminados que oscilan de 10 a 30 minutos. Se añadió tampón citrato 100 mM (pH 3,0, que contenía SDS al 2%) (400 µl) a cada una de las mezclas de reacción resultantes para detener la reacción enzimática (pretratamiento). La mezcla de reacción (20 µl) se diluyó con un tampón 2 de ELISA (1,0 ml), y la mezcla resultante se empleó como muestra pretratada. La cantidad de adiponectina que permanece en la muestra pretratada se determinó mediante el uso del sistema ELISA de medición de adiponectina que se describirá más adelante.

Ejemplo 11 Tratamiento con proteasa para la medición de la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA

- 20 De una manera similar a la empleada en el Ejemplo 10, cada uno de los múltimero de adiponectina separados y los productos purificados obtenidos en el Ejemplo 3 se añadieron a un plasma con Ad eliminada a una concentración final de 10 µg/ml más o menos, y la mezcla resultante se empleó como una muestra para la investigación. La proteasa A "Amano" se disolvió en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) para preparar una solución de 0,6-1,0 mg/mL, y la solución se empleó como una solución enzimática de pretratamiento. La solución enzimática de pretratamiento (90 µl) se añadió a cada una de las muestras (10 µl), y la mezcla se hizo reaccionar a 37°C durante períodos predeterminados que oscilaron de 10 a 30 minutos. Se añadió tampón citrato 100 mM (pH 3,0, que contenía SDS al 2%) (400 µl) a cada una de las mezclas de reacción resultantes para detener la reacción enzimática (pretratamiento). La mezcla de reacción (20 µl) se diluyó con un tampón 2 de ELISA (1,0 ml), y la mezcla se empleó como una muestra pretratada. La cantidad de adiponectina que permanece en la muestra pretratada se determinó mediante el uso del sistema ELISA de medición de adiponectina que se describirá más adelante.

Ejemplo 12 Preparación de las muestras para la determinación de la cantidad total de la adiponectina

- 35 Los autores de la presente invención han desarrollado un método (Solicitud Internacional que reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Japonesa Núm. 2003-354715), en el que al menos uno de un agente reductor, un ácido o una sal del mismo, un agente tensioactivo, y una proteasa se añaden a una muestra biológica para la reacción con la adiponectina, con lo que se forman múltimeros de adiponectina en una forma específica para el inmunoanálisis. En el presente Ejemplo, se emplearon un ácido y un agente tensioactivo en el pretratamiento. Específicamente, se añadió tampón citrato 100 mM (pH 3,0, que contenía SDS al 2%) (490 µl) a plasma humano o a suero humano (10 µl), y la mezcla se agitó cuidadosamente. La mezcla de reacción (20 µl) se diluyó con un tampón 2 de ELISA (1,0

ml), y la mezcla se empleó como una muestra pretratada. La cantidad de adiponectina que permanece en la muestra pretratada se determinó mediante el uso del sistema ELISA de medición de adiponectina que se describirá más adelante.

5 Ejemplo 13 Sistema ELISA de medición de adiponectina

Una placa de ELISA se sensibilizó con un anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana (64405) que había sido diluido con PBS a 5 µg/ml. La placa se bloqueó con un tampón 2 de ELISA. Cada una de las muestras tratadas previamente preparadas en los Ejemplos 10 y 11 se añadió y se hizo reaccionar con la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó con un líquido de lavado de ELISA. Se hizo reaccionar anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana marcado con biotina (64404) que había sido diluido 2000 veces con un tampón 2 de ELISA con la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió HRP-Avidina que se había diluido 2000 veces con un tampón 2 de ELISA y se hizo reaccionar con la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó con un líquido de lavado de ELISA. Se desarrolló color con un líquido de desarrollo de color OPD (tampón citrato 250 mM que contenía 2 mg/ml de hidrócloruro de ortofenilendiamina y peróxido de hidrógeno al 0,02%, pH 5,0). Se añadió una solución de parada (ácido sulfúrico 1,5 N, EDTA-2Na 1 mM) a la placa para detener la reacción, y se midió la absorbancia a 492 nm. Por separado, se preparó una muestra estándar. Específicamente, la solución enzimática de pretratamiento (90 µl) y tampón citrato 100 mM (pH 3,0, que contenía SDS al 2%) (400 µl) se mezclaron entre sí, y cada una de las muestras (10 µl) se añadió a la mezcla. La muestra estándar también se midió a través de ELISA de una manera similar a la descrita anteriormente, y el valor del desarrollo de color de la muestra estándar se definió como 100%. El valor de la medición obtenido a partir de cada una de las muestras preparadas en los Ejemplos 10 y 11 se convirtió en %. En cada caso, se calculó el valor medio de los valores del porcentaje de desarrollo de color obtenido de ese modo. Los resultados obtenidos a partir de las muestras preparadas en los Ejemplos 10 y 11 se muestran en las Figs. 10 y 11, respectivamente.

Como se desprende de los resultados mostrados en la Figura 10, a través de tratamiento con la proteasa (proteínasa K), los multímeros de Ad distintos de Ad PMA contenidos en el plasma son digeridos, y se puede realizar el análisis dirigido específicamente a Ad PMA. Los resultados mostrados en la Fig. 11 indican que, a través del tratamiento con la proteasa (proteasa A "Amano"), se digieren multímeros de Ad distintos de Ad PMM y Ad PMA contenidos en el plasma, con lo cual la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA se puede determinar de una manera dirigida específicamente a Ad PMM y Ad PMA. La cantidad de Ad PMM se puede calcular a través de la resta de la cantidad de Ad PMA de la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA.

Como se desprende de los resultados descritos anteriormente, la cantidad presente de Ad PMUB en una muestra se puede calcular de la siguiente manera: la muestra se trata previamente en una manera similar a la descrita en el Ejemplo 12, se determina la cantidad total de adiponectina contenida en la muestra resultante, la cantidad de Ad PMB se determina de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 6 o 7, la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA se determina de una manera similar a la descrita en los Ejemplos 11 y 13, y la cantidad de Ad PMB y la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA se restan de la cantidad total de adiponectina. Por lo tanto, se pueden analizar selectivamente los cuatro tipos de multímero de adiponectina en sangre humana, y se puede determinar la cantidad total de estos cuatro tipos de adiponectina.

Ejemplo de Referencia 14 Relación con la enfermedad arteriosclerótica

Doscientos noventa y ocho (298) pacientes que sufrían de diabetes tipo II, pero que no habían recibido tratamiento con insulina se dividieron en dos grupos, es decir, un grupo con enfermedad arterial coronaria (CAD) (90 pacientes que tenían una lesión orgánica detectada a través de una angiografía coronaria (CAG)) y un grupo con enfermedad arterial no coronaria (NCAD) (el resto, 208 pacientes). De una manera similar a la descrita anteriormente en los Ejemplos, se determinó el contenido en adiponectina total (Ad T.), y cada uno de los multímeros de adiponectina se analizó de forma selectiva. Específicamente, el contenido de Ad T. se determinó mediante los métodos descritos en los Ejemplos 12 y 13; el contenido de Ad PMA se determinó mediante los métodos descritos en los Ejemplos 10 y 13, y el contenido Ad PMM se calculó mediante la resta del contenido de Ad PMA de la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA determinada mediante el método descrito en los ejemplos 11 y 13. La cantidad total de Ad PMUB y Ad PMB se calculó a través de la resta de la cantidad total de Ad PMM y Ad PMA del contenido de Ad T. Las cantidades obtenidas de multímeros se compararon mediante la prueba t con el fin de determinar si existe o no una diferencia significativa entre el grupo CAD y el grupo NCAD.

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Entre el grupo de CAD y el grupo NCAD, no se observó diferencia significativa en el contenido de Ad T., pero se observó una diferencia significativa en el contenido de Ad PMA ($p < 0,05$). En la razón (%) del contenido de Ad PMA con respecto al contenido de Ad T., se observó una diferencia significativa obvia ($p < 0,0001$). Los resultados revelan que, el contenido de Ad PMA, especialmente la razón (%) del contenido de Ad PMA con respecto al contenido de Ad T., puede servir como un indicador más exacto de CAD que el contenido de Ad T.

[Tabla 4]

	CAD		NCAD		Valor de p
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	
Contenido de Ad T. en plasma (µg/mL)	9,64	6,73	9,92	6,15	0,726
Contenido de Ad PMA en plasma (µg/mL)	3,00	2,70	3,76	3,11	0,046
Contenido de Ad PMM en plasma (µg/mL)	4,32	3,06	4,02	2,41	0,374
Contenido total de Ad PMUB y Ad PMB (µg/mL)	2,34	1,92	2,18	1,60	0,463
Ad PMA/Ad T en plasma. (%)	27,0	10,2	34,2	10,9	<0,0001
Ad PMM/Ad T en plasma (%)	43,6	11,5	42,0	11,8	0,260

Ejemplo de Referencia 15 Relación con el síndrome metabólico

- 5 Los 298 pacientes empleados en el Ejemplo 14 se dividieron en cuatro grupos sobre la base del contenido total de adiponectina (Ad T) y la razón del contenido de Ad PMA con respecto al contenido de Ad T, es decir, Ad PMA/Ad T x 100 % (R PMA), mediante el uso de los siguientes criterios. En primer lugar, se calcularon los valores medios de Ad T y R PMA para que fueran 9,8 µg/ml y 32%, respectivamente. Los pacientes que mostraron valores de Ad T y R PMA que eran inferiores a los respectivos valores medios se clasificaron en el grupo A; los pacientes que mostraron valores de Ad T que eran menores que el valor medio y que mostraron valores de R PMA que eran iguales o superiores al valor medio se clasificaron en el Grupo B; los pacientes que mostraron valores de Ad T que eran iguales o mayores al valor medio y que mostraron valores de R PMA que eran menores que el valor medio se clasificaron en el Grupo C, y los pacientes que mostraron valores de Ad T y R PMA que eran iguales o superiores a los respectivos valores medios, se clasificaron en el Grupo D. Además, los pacientes dentro de cada grupo se dividieron en dos grupos en vista de los criterios de diagnóstico del síndrome metabólico (JAMA, 285:2486, 2001) US Adult Treatment Panel III (ATP III), es decir, un primer grupo formado por pacientes que mostraban, en dos o más de los cinco elementos de los factores de riesgo, niveles de los factores de riesgo que eran superiores a los criterios respectivos, y un segundo grupo formado de los pacientes que mostraban, en menos de dos elementos de los factores de riesgo, niveles de los factores de riesgo que eran superiores a los criterios respectivos. Por lo general, de acuerdo con los criterios diagnósticos del ATP III, se define que un paciente que tenga, en cualquiera de los tres o más elementos, niveles de los factores de riesgo que sean más altos que los respectivos criterios sufre síndrome metabólico. Sin embargo, en el presente ejemplo, se empleó un criterio más severo. Los resultados se muestran en la Tabla 5.
- 25 Una prueba de Kruskal-Wallis reveló que el número de elementos del criterio diagnóstico del síndrome metabólico tiene una correlación estadísticamente significativa con los valores de Ad T y R PMA (valor de p = 0,001). En los grupos A y C, que consisten en pacientes que exhiben valores de R PMA que son menores que el valor medio, la proporción de pacientes clasificados para el grupo que exhibe dos o más elementos del criterio de diagnóstico del síndrome metabólico era más grande. Los resultados indican que, en comparación con el valor de Ad T, el valor de R PMA puede servir como un buen indicador para el síndrome metabólico. Es decir, los autores de la presente invención han encontrado por primera vez que la medición del valor de R PMA y uso del valor de R PMA como un índice para el síndrome metabólico son eficaces en la prevención o el pronóstico del síndrome metabólico.

[Tabla 5]

	Menos de 2 elementos	2 o más elementos
Grupo A	44	92
Grupo B	29	21
Grupo C	6	13
Grupo D	50	43
(pacientes)		

- 5 Como se desprende de la descripción anterior, incluso cuando el uso del contenido total de adiponectina como un índice para una enfermedad o estado patológico no es suficiente para la evaluación de la enfermedad o el estado patológico, el análisis de un cierto tipo de multímeros de Ad o la razón de la cantidad de cierta fracción del multímero de Ad con respecto a la cantidad total de adiponectina permite el pronóstico y la prevención de la enfermedad o la evaluación del estado patológico.

REIVINDICACIONES

1. Un método para someter a inmunoanálisis selectivamente un multímero de adiponectina diana seleccionado entre adiponectina peso molecular medio (Ad PMM) o adiponectina de peso molecular ultra bajo (Ad PMUB) en una muestra biológica, que comprende:

- (1) para someter a inmunoanálisis selectivamente adiponectina de peso molecular medio (Ad PMM):
 - (a) hacer reaccionar una muestra con una proteasa que digiere específicamente Ad PMUB y LMW Ad;
 - (b) determinar la cantidad total de la adiponectina Ad PMM y Ad PMA no digerida que queda en la muestra tratada en la etapa (a);
 - (c) determinar la cantidad de Ad PMA en la muestra biológica a través de la reacción de una proteasa con una muestra que contiene adiponectina, mediante la cual se digiere la adiponectina distinta de Ad PMA, y analizar selectivamente la Ad PMA que permanece después de la digestión con la proteasa mediante el uso de un anticuerpo anti-adiponectina, y
 - (d) restar la cantidad de Ad PMA detectada en (c) de la cantidad total de adiponectina cuantificada en (b), donde la cantidad de Ad PMM corresponde a la cantidad cuantificada en (b) menos la cantidad de Ad PMA cuantificada en (c); o
 - (e) restar la cantidad total de Ad PMUB y Ad PMB convertidas, que se ha determinado en la etapa (a) de la cantidad total de Ad PMUB, Ad PMB y Ad PMM como la cantidad total de adiponectina convertida mediante el uso de una proteasa para determinar la cantidad de Ad PMA según la etapa (c);
- (2) para someter a inmunoanálisis selectivamente adiponectina de peso molecular ultra bajo Ad PMUB, la cantidad de Ad PMUB contenida en una muestra se determina
 - a. tratando la Ad PMUB y la Ad PMB con la proteasa que digiere específicamente Ad PMUB y Ad PMB,
 - b. calculando la cantidad total de Ad PMA y Ad PMM que queda, y
 - c. restando de la cantidad total de Ad PMA y Ad PMM y la cantidad de Ad PMB de la cantidad total de adiponectina, que se ha determinado selectivamente, o
 - d. restando, de la cantidad total de adiponectina, la cantidad total de Ad PMB, Ad PMM y Ad PMA.

2. El método de la reivindicación 1, donde para el inmunoanálisis selectivo de Ad PMM dicha proteasa en la etapa (a) es una proteasa derivada de un microorganismo seleccionado del género *Bacillus*, *Aspergillus*, y *Staphylococcus*.

3. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad de Ad PMA en una muestra biológica se cuantifica en la etapa (c) :

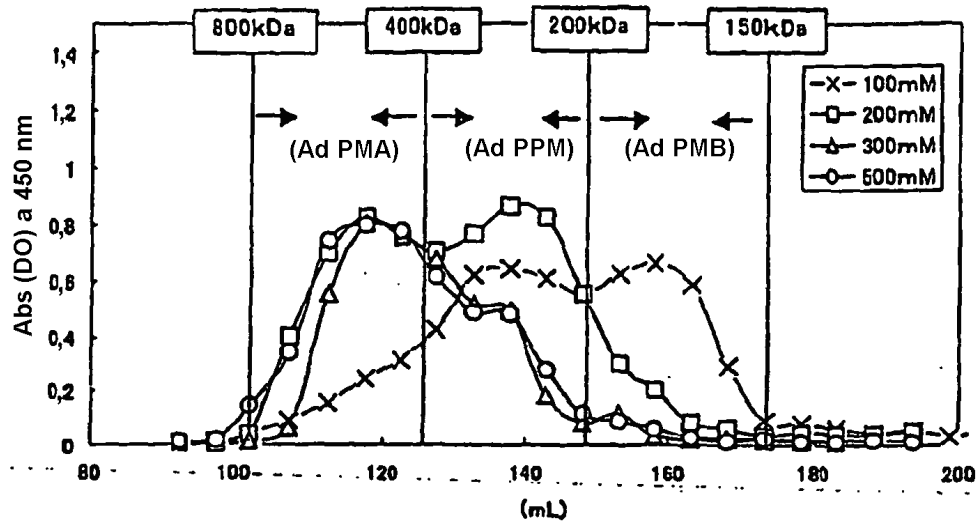
- (i) haciendo reaccionar la muestra que contiene adiponectina con al menos una proteasa que se puede modificar químicamente para digerir selectivamente adiponectina distinta de Ad PMA en la muestra, donde la al menos una proteasa se selecciona del grupo que consiste en proteinasa K derivada del género *Tritirachium* y proteasa derivada de un microorganismo perteneciente al género *Aspergillus* o al género *Bacillus*, y
- (ii) cuantificando inmunológicamente la Ad PMA utilizando un anticuerpo anti-adiponectina.

4. El método de la reivindicación 1, en donde para someter a inmunoanálisis selectivamente la Ad PMM dicha proteasa en la etapa (a) es una proteasa seleccionada del grupo que consiste de proteasa S "Amano", proteasa A "Amano", sumizyme FP, sumizyme LP50D, y proteasa V8 .

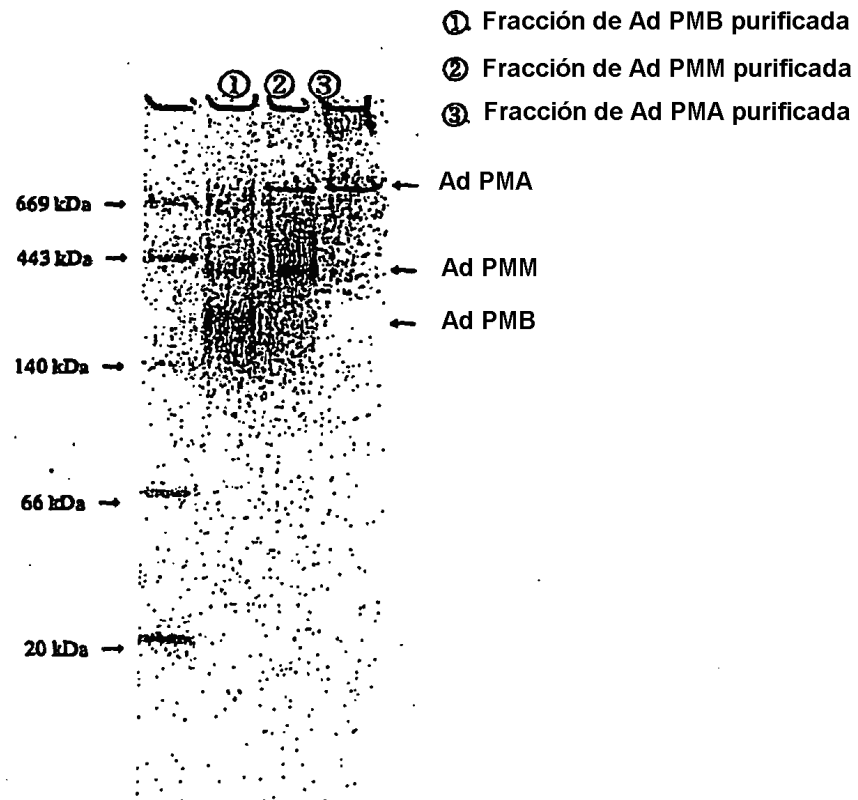
5. El método de la reivindicación 1, donde para someter a inmunoanálisis selectivamente la Ad PMB el anticuerpo anti-adiponectina forma un complejo con Ad PMB, y la cantidad del complejo se utiliza para determinar la cantidad de Ad PMB en dicha muestra biológica.

6. El método según la reivindicación 1, donde la muestra biológica se obtiene a partir de un ser humano.

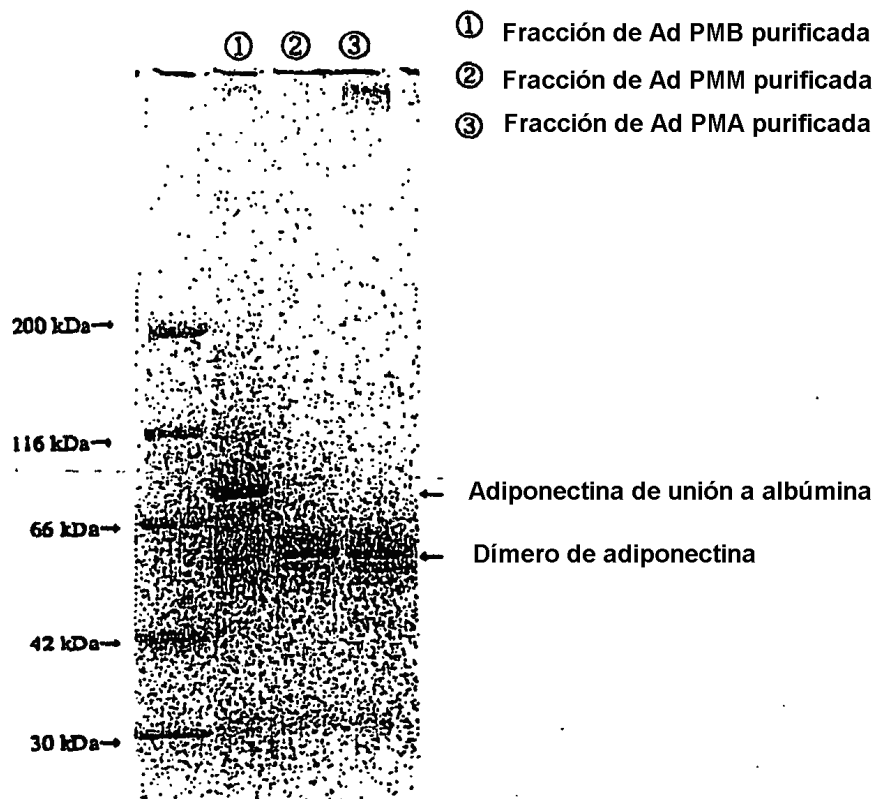
[Fig. 1]



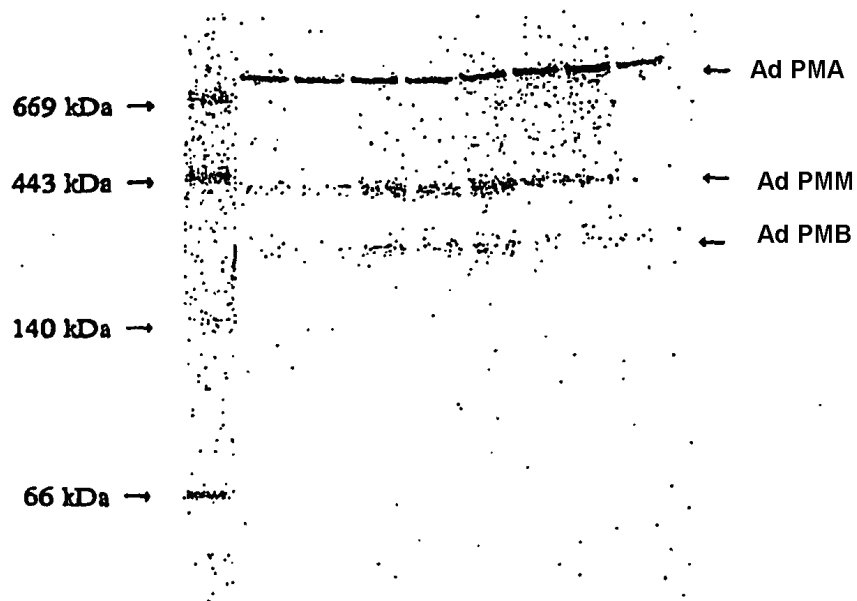
[Fig. 2]



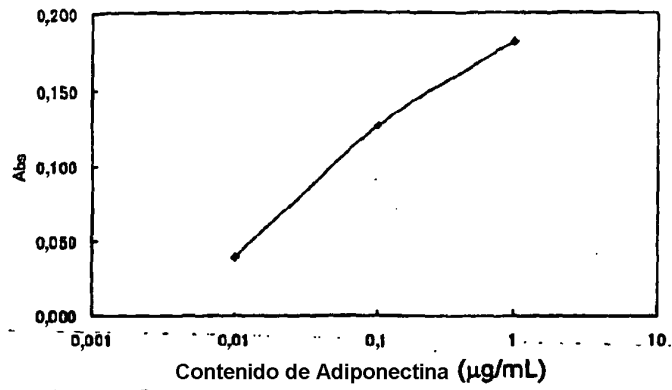
[Fig. 3]



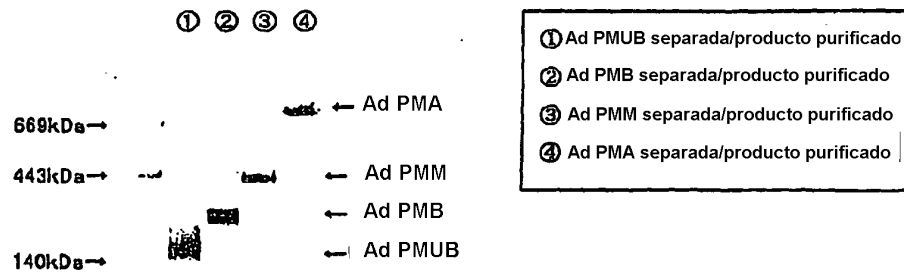
[Fig. 4]



[Fig. 5]



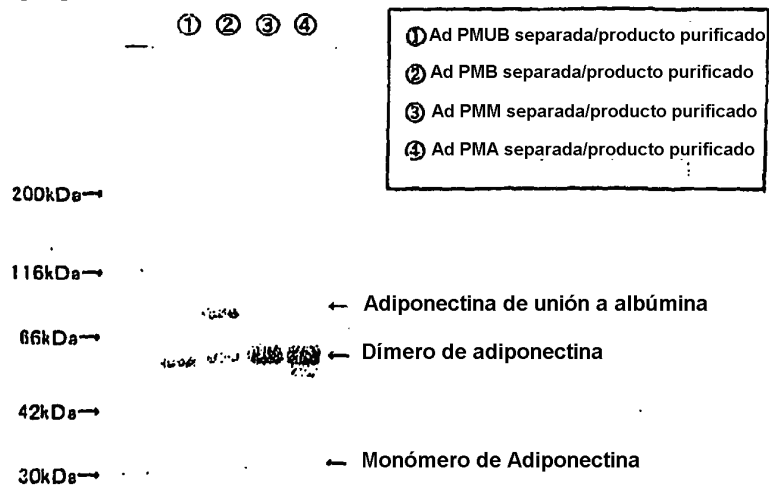
[Fig. 6]



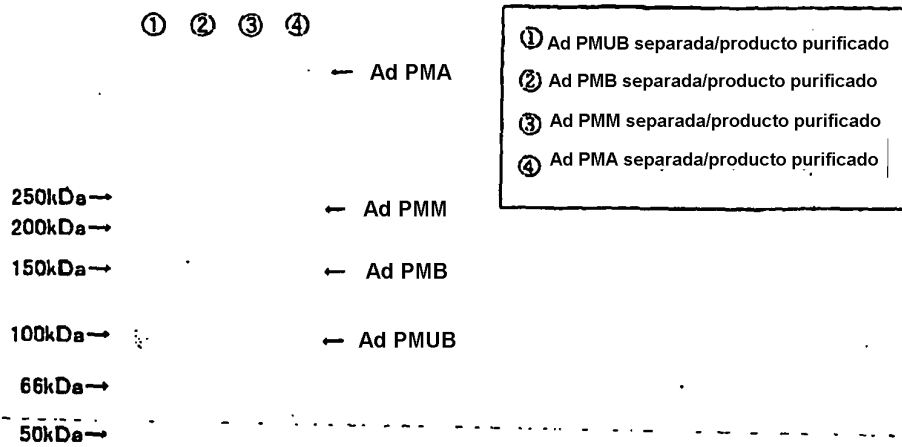
66kDa →

20kDa →

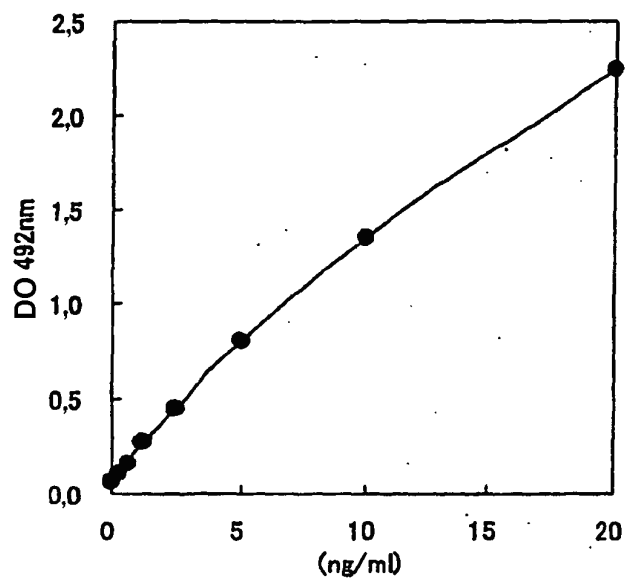
[Fig. 7]



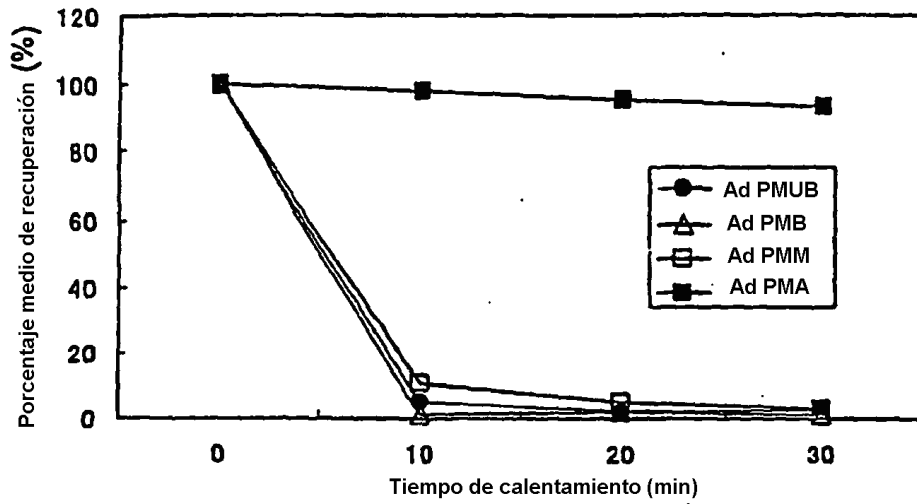
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

