

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 559**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/545 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2010 E 10772175 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2431391**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal para analizar adiponectina de peso molecular alto y uso del mismo**

30 Prioridad:

07.05.2009 JP 2009112624

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

19.02.2016

73 Titular/es:

LSI MEDIENCE CORPORATION (50.0%)
13-4, Uchikanda 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8517, JP y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

AKAMATSU, SUGURU;
KATSURAGI, KIYONORI;
ONISHI, HIDEAKI;
ABE, MIDORI;
HADAMA, TORU;
NISHIMURA, AYAKO y
OOGUCHI, MIO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 560 559 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

Anticuerpo monoclonal para analizar adiponectina de peso molecular alto y uso del mismo

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo monoclonal específico de adiponectina de peso molecular alto y a un procedimiento para analizar específicamente (en particular medir) la adiponectina de peso molecular alto usando el anticuerpo monoclonal.

Técnica anterior

10 La adiponectina es una proteína secretora que se expresa específicamente en los adipocitos y se ha comunicado que exhibe un efecto anti-arterioesclerótico y un efecto reductor de la resistencia a la insulina. En los últimos años, se ha comunicado que la adiponectina está implicada en el cáncer, inflamación y síndrome metabólico, y se considera que actúa como factor defensor en el organismo vivo. La adiponectina humana consiste en 244 restos de aminoácidos y se sabe que tiene un peso molecular de aproximadamente 28 kDa como monómero. Se ha confirmado que la adiponectina está presente en la sangre en forma de un trímero (PMB: peso molecular bajo) como estructura básica, un hexámero (PMM: peso molecular medio) compuesto por el trímero, y multímeros (PMA: peso molecular alto) compuesto por uno o más PMB y/o PMM.

15 Estas diversas formas de la adiponectina exhiben diferentes efectos fisiológicos. Por ejemplo, se ha comunicado que las de PMA y PMM activaban NF- κ B en una línea celular C2C12, pero la de PMB no. Adicionalmente, se ha notificado que las personas con déficit de secreción de adiponectina no podían producir adiponectina de PMA y sufrían hipoadiponectinemia y diabetes, y que la proporción del contenido de adiponectina de PMA disminuía en pacientes con arteriopatía coronaria en comparación con las personas sanas. Adicionalmente, se ha informado que la adiponectina cuyos niveles cambiaban antes y después de una dieta era de PMA. Por consiguiente, es importante detectar adiponectina de PMA individualmente en los estudios de adiponectina y varias enfermedades.

20 En general, se puede detectar una molécula de proteína usando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína como antígeno. No obstante, en el caso en el que el antígeno sea una mezcla de multímeros en varias formas compuestos por monómeros sencillos tales como adiponectina, es difícil obtener un anticuerpo específico de solo una molécula que tiene un tamaño específico. Dado que un anticuerpo normalmente reconoce una secuencia de aminoácido primaria de un antígeno, cuando un antígeno es multímero, Dado que la adiponectina está compuesta por monómeros sencillos, un anticuerpo que reconoce el monómero de adiponectina simultáneamente reconoce los multímeros de adiponectina en cualquier forma. Incluso si un anticuerpo monoclonal reconoce una estructura terciaria, no se puede evitar la reactividad cruzada con otras moléculas en una molécula tal como adiponectina de PMA en la que se polimerizan muchas estructuras básicas.

25 Por tanto, en el caso de usar un anticuerpo general, es difícil detectar una molécula de adiponectina que tiene un tamaño específico solo.

30 Para determinar de forma cuantitativa la adiponectina que tiene un tamaño molecular específico, como procedimientos convencionales, generalmente se usan un procedimiento en el que la adiponectina se pretrata (por ejemplo, filtración en gel) para fraccionarla basado en su peso molecular y se detecta cada pico, y un procedimiento en el que se digieren una o más moléculas específicas y se detecta la molécula restante. Adicionalmente se desarrolló una técnica de ELISA que no necesita pretratamiento, tal como filtración en gel o un tratamiento con proteasa, pero se observa reactividad cruzada con la de PMM, y la técnica de ELISA no es específica del PMA. Por tanto se desea una técnica capaz de detectar adiponectina que tiene un tamaño molecular específico individualmente mediante un pretratamiento simple o sin pretratamiento.

35 Como procedimientos convencionales para medir la adiponectina que tiene un tamaño molecular específico, además del procedimiento de filtración en gel mencionado anteriormente se conocen los siguientes dos procedimientos:

- 40 (1) un procedimiento en el que se lleva a cabo un pretratamiento con una enzima que digiere PMB y PMM y la adiponectina restante que no es digerida por la enzima se mide para detectar el PMA solo (literatura de patente 1), y
- 45 (2) un procedimiento en el que se usa un anticuerpo que no reacciona con el monómero de adiponectina pero que reconoce un trímero y/o su molécula asociada, la adiponectina de peso molecular alto, para detectar el antígeno de la adiponectina de peso molecular alto solo (literatura de patente 2).

50 No obstante, el pretratamiento con la enzima necesita un tiempo de tratamiento enzimático de varias decenas de minutos. Además, en el caso de la incubación durante un tiempo prolongado que supera un tiempo óptimo, existe la posibilidad de que la molécula diana *per se* pueda ser digerida por una proteasa coexistente y, por tanto, es necesario seleccionar de forma estricta el tiempo de incubación. Adicionalmente, en el tratamiento con una enzima se deberá seleccionar una enzima digestiva óptima de acuerdo con el tipo de un antígeno diana y, por tanto, no es un procedimiento versátil.

En el caso de usar el anticuerpo convencional que reconoce la adiponectina de peso molecular alto, no solo se reconoce la adiponectina de peso molecular alto (PMA) sino también otros multímeros (PMB y PMA) y, por tanto, no es un procedimiento capaz de detectar específicamente el PMA solo. Se desconoce un anticuerpo que reconoce de forma específica la adiponectina de PMA solo.

- 5 Nakano y col. ("A novel enzyme-linked immunosorbent assay specific for high-molecular-weight adiponectin", Journal of Lipid Research, vol. 47, 2006, páginas 1572 – 1582) describen el anticuerpo monoclonal antiadiponectina de PMA, IH7. Se produjo el IH7 contra la adiponectina de PMA y reacciona de forma cruzada con las formas de adiponectina hexamérica y trimérica.

Lista de citas

10 **Literatura de Patente**

[Literatura de patente 1] WO2005/038457
 [Literatura de patente 2] patente japonesa N° 3624216

Resumen de la invención

Problema técnico

- 15 En el ELISA convencional para detectar PMA sin pretratamiento, existe el problema de que se observa reactividad cruzada con el PMM en una muestra que contiene un nivel elevado de PMM y, de hecho, fue difícil la medición específica de PMA. Además, incluso si un anticuerpo muestra una selectividad alta por el PMA en el ELISA, el anticuerpo a veces pierde la selectividad por el PMA mediante marcaje con látex y, por tanto, fue muy difícil medir fácilmente la adiponectina de PMA usando látex. Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal para detectar selectivamente o determinar de forma cuantitativa la adiponectina de PMA individualmente, sin mostrar reactividad cruzada con la adiponectina de PMM y un reactivo altamente preciso y versátil para analizar la adiponectina de peso molecular alto.
- 20

Solución al problema

- 25 Los presentes inventores construyeron un reactivo de látex para analizar la adiponectina de alto peso molecular capaz de detectar de forma más conveniente y selectiva o determinar cuantitativamente la adiponectina de PMA de forma individual y someter a detección selectiva de un anticuerpo monoclonal usado en el reactivo de látex. Como resultado, se confirmó que incluso cuando se usó un anticuerpo que mostró una especificidad relativamente alta por el PMA en un ELISA de tipo sándwich, el anticuerpo no mostró ninguna especificidad de PMA cuando se evaluó como un reactivo de látex y, por tanto, los presentes inventores produjeron un nuevo anticuerpo monoclonal usando la fracción de PMA sola de adiponectina en sangre humana. Los presentes inventores confirmaron que este anticuerpo monoclonal tenía reactividades similares en el análisis de transferencia de Western en comparación con los anticuerpos monoclonales preparados usando la adiponectina recombinante expresada en E. coli, pero mostró una especificidad por PMA extremadamente alta cuando se evaluó mediante un sistema de ELISA de tipo sándwich. Adicionalmente, los presentes inventores construyeron un reactivo de látex para analizar la adiponectina usando el anticuerpo monoclonal y encontraron que la adiponectina de PMA podía medirse de forma selectiva usando el reactivo de látex sin reactividad cruzada con el PMM y completaron la presente invención.
- 30
- 35

La presente invención se refiere a:

- 40 [1] un anticuerpo monoclonal caracterizado porque reacciona específicamente con la adiponectina de peso molecular alto producida por el hibridoma depositado como FERMBP-11106,
 [2] un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal de [1], caracterizado por el uso de adiponectina de peso molecular alto como antígeno,
 [3] un procedimiento para analizar inmunológicamente la adiponectina de peso molecular alto caracterizado por usar el anticuerpo monoclonal de [1],
 [4] el procedimiento de [3], en el que el procedimiento es un procedimiento de aglutinación de látex,
 45 [5] un reactivo para analizar inmunológicamente la adiponectina de peso molecular, que comprende el anticuerpo monoclonal de [1], y
 [6] el reactivo de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende partículas de látex portadoras del anticuerpo monoclonal de [1].

Efectos ventajosos de la invención

- 50 De acuerdo con el nuevo anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede proporcionar un reactivo más conveniente y preciso (en particular, un reactivo de látex) y procedimiento para analizar la adiponectina de peso molecular alto (PMA) capaz de analizar de forma selectiva (detectar o medir de forma cuantitativa) la adiponectina de peso molecular alto.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de adiponectina contenida en las fracciones de la filtración en gel de una muestra de suero humano (que muestra un nivel bajo de PMM) usando varios kits de ELISA usando anticuerpos monoclonales conocidos.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de adiponectina contenida en las fracciones de la filtración en gel de una muestra de suero humano (que muestra un nivel alto de PMM) usando los mismos kits de ELISA que los usados en la FIG. 1.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de adiponectina contenida en las fracciones de la filtración en gel de una muestra de suero humano usando un reactivo de látex preparado usando el anticuerpo monoclonal conocido ANOC9121.

La FIG. 4 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de adiponectina contenida en las fracciones de la filtración en gel de una muestra de suero humano (que muestra un nivel bajo de PMM) usando el kit de ELISA de la presente invención, así como los mismos kits de ELISA que los usados en la FIG. 1.

La FIG. 5 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de adiponectina contenida en las fracciones de la filtración en gel de una muestra de suero humano (que muestra un nivel alto de PMM) usando los mismos kits de ELISA que los usados en la FIG. 4.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de adiponectina contenida en las fracciones de la filtración en gel de una muestra de suero humano usando el reactivo de látex de la presente invención preparado usando el anticuerpo monoclonal Clone8D de la presente invención.

Descripción de las realizaciones

El anticuerpo monoclonal de la presente invención reacciona específicamente con la adiponectina de peso molecular alto. La expresión “reacciona específicamente con la adiponectina de peso molecular alto” como se usa en el presente documento significa que reacciona con la adiponectina de peso molecular alto, no reacciona con la adiponectina trimérica y no reacciona sustancialmente con la adiponectina hexamérica. La adiponectina de peso molecular alto, la adiponectina trimérica y la adiponectina hexamérica en ocasiones se denominan adiponectina de PMA, adiponectina de PMM y adiponectina de PMB (o simplemente se denominan PMA PMM y PMB, respectivamente).

La expresión “adiponectina de peso molecular alto” como se usa en el presente documento significa multímeros de los que la estructura básica es un polímero de PMB y/o PMM y que se fraccionan en condiciones no desnaturizantes en fracciones de aproximadamente 440 kDa o más (es decir, el límite entre PMA y PMM es de aproximadamente 440 kDa) con un pico de aproximadamente 670 kDa.

Estos pesos moleculares son valores determinados mediante filtración en gel realizada en ejemplos comparativos y ejemplos descritos más adelante y las condiciones para la filtración en gel son los siguientes.

Columna: Superdex 200 prep grade (GE Healthcare Bioscience)

Fase móvil (disolvente): D-PBS

Velocidad de bombeo: 1 ml / min

Marcadores de peso molecular:

(1) seroalbúmina bovina: 67.000 (Da)

(2) aldolasa: 158.000

(3) catalasa: 232.000

(4) ferritina: 440.000

(5) tiroglobulina: 669.000

(6) Dextrano azul 2000: 2.000.000

La expresión “no reacciona sustancialmente con la adiponectina hexamérica (PMM)” como se usa en el presente documento significa que no reacciona con moléculas que tienen un pico aproximadamente a 400 kDa y que eluye aproximadamente entre 250 y 440 kDa mediante fraccionamiento de un suero humano en condiciones no desnaturizantes.

El anticuerpo específico de la adiponectina de PMA de la presente invención se puede preparar de acuerdo con un procedimiento convencional para preparar anticuerpos monoclonales, a excepción de que la adiponectina que se recoge directamente de un organismo humano y se fracciona en PMA se usa como antígeno.

La muestra biológica que procede de un organismo humano y que se usa como antígeno no está particularmente limitada, siempre que sea un líquido biológico del que se sospecha que contiene adiponectina de PMA. Los ejemplos de la muestra incluyen un fluido biológico (por ejemplo, sangre (es decir, sangre entera), suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo o fluidos secretores) recogido directamente de un organismo vivo y un líquido procedente de material biológico (por ejemplo, varios extractos de órganos, tejidos o células o varios líquidos de cultivo de tejidos o células) obtenido mediante el tratamiento de materiales biológicos (por ejemplo, órganos, tejidos o células) recogidos de un organismo vivo.

Una fracción de adiponectina de PMA como antígeno se puede preparar mediante fraccionamiento de la muestra biológica en una fracción que contiene adiponectina con diversos pesos moleculares, incluyendo adiponectina de PMA, y separando la adiponectina de PMA de la fracción mediante cromatografía de filtración en gel. La fracción que contiene adiponectina con diversos pesos moleculares, incluyendo adiponectina de PMA se puede obtener mediante cromatografía de afinidad inmovilizada con un anticuerpo que reconoce la adiponectina de PMA. El anticuerpo que se va a inmovilizar no está particularmente limitado, siempre que pueda reconocer al menos la adiponectina de PMA, y se puede usar un anticuerpo que reconoce la adiponectina de PMM y/o de PMB. La cromatografía de afinidad o la cromatografía de filtración en gel se puede llevar a cabo adecuadamente de acuerdo con un anticuerpo usado, la cantidad de una muestra biológica, y similares. La cromatografía de afinidad se puede realizar después de la separación mediante cromatografía de filtración en gel.

El anticuerpo monoclonal frente a la adiponectina de PMA obtenida se puede usar en un procedimiento para medir de forma selectiva la adiponectina de PMA, como una molécula de inmunoglobulina per se, o como un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv), que se puede preparar de acuerdo con un procedimiento convencional.

La muestra de ensayo que se va a analizar mediante la presente invención no está particularmente limitada, siempre que sea un líquido biológico que se sospeche que contiene adiponectina de PMA. Los ejemplos de la muestra incluyen un fluido biológico (por ejemplo, sangre (es decir, sangre entera), suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo o fluidos secretorios) recogido directamente de un organismo vivo y un líquido procedente de material biológico (por ejemplo, varios extractos de órganos, tejidos o células o varios líquidos de cultivo de tejidos o células) obtenido mediante el tratamiento de materiales biológicos (por ejemplo, órganos, tejidos o células) recogidos de un organismo vivo.

La adiponectina de PMA está presente, por ejemplo, a una concentración de 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml en sangre humana normal. Como alternativa, la concentración de la adiponectina de PMA contenida en un líquido procedente de material biológico se puede ajustar a de 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml, mediante la determinación adecuada de la cantidad de un líquido de tratamiento (por ejemplo, una solución para extracción o una solución para cultivo) de un ensayo piloto o similar.

Como anteriormente, un líquido biológico (en particular sangre) que se va a analizar mediante la presente invención contiene adiponectina de PMA a una concentración de 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml y, por tanto, se puede analizar, sin dilución previa, mediante el reactivo de la presente invención para analizar la adiponectina de PMA.

Como el procedimiento para analizar la adiponectina de PMA de la presente invención se pueden usar procedimientos de medición inmunológica convencional. Los ejemplos del procedimiento de medición inmunológica incluyen un procedimiento de ELISA, un procedimiento RIA, un procedimiento de aglutinación y un procedimiento de inmunocromatografía. En lo sucesivo en el presente documento se explicará más particularmente un procedimiento de aglutinación.

Como las partículas de látex usadas en la presente invención, se pueden usar las partículas de látex convencionales, tales como las partículas de látex hechas de poliestireno, un copolímero de estireno-sulfonato de estireno, o similares. El tamaño de partícula promedio de las partículas de látex portadoras del anticuerpo específico de la adiponectina de PMA se puede seleccionar de forma adecuada del intervalo de 0,05 a 1,0 µm en general, de acuerdo con, por ejemplo, el tipo de líquido biológico usado como muestra, la concentración de adiponectina de PMA contenida o el aparato de medición.

Por ejemplo, en un caso de análisis de la adiponectina de PMA en sangre, dado que la adiponectina de PMA está presente en una muestra humana normal a una concentración alta de 1 µg/ml a varias decenas de µg/ml, el intervalo de medición de un sistema de ensayo para la adiponectina de PMA en sangre se puede garantizar seleccionando adecuadamente el tamaño de partícula de látex. Más particularmente, cuando el tamaño de partícula es de 0,1 µm o menos, a veces no se garantiza la precisión en la medición de las concentraciones de 5 µg/ml o menos que son clínicamente significativas. Cuando el tamaño de partícula es de 0,5 µm o más, en ocasiones no se puede medir una muestra normal con un nivel elevado. Por tanto, como el sistema de ensayo para la adiponectina de PMA en sangre, son preferibles las partículas de látex que tiene un tamaño de partícula promedio de 0,1 a 0,5 µm.

El reactivo de látex para analizar la adiponectina de PMA de la presente invención puede estar en cualquier forma, siempre que contenga una suspensión líquida de partículas de látex portadoras del anticuerpo monoclonal específico de la adiponectina de PMA. El reactivo de látex puede estar en varias formas, por ejemplo, un reactivo componente de un líquido que contiene un tampón y partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo específico de la adiponectina de PMA, un reactivo componente de dos líquidos compuesto por un tampón como primer componente reactivo y partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo específico de adiponectina de PMA como segundo componente reactivo, o similares.

En el procedimiento para analizar la adiponectina de PMA de la presente invención se puede recoger un fluido biológico que se sospecha que contiene adiponectina; el fluido biológico obtenido puede considerarse como una muestra sin dilución previa y/o pretratamiento (es decir, mientras se mantiene en el estado original) o, como

alternativa, la muestra obtenida se puede tratar adecuadamente para preparar una muestra; y la muestra se puede poner en contacto con la suspensión líquida de partículas de látex portadoras del anticuerpo específico de la adiponectina de PMA de la presente invención (preferentemente, el reactivo de látex para analizar la adiponectina de PMA de la presente invención).

5 Por ejemplo, una realización preferida del procedimiento de la presente invención, un procedimiento para analizar la adiponectina de PMA usando un aparato de análisis automático incluye:

(1) obtener un fluido biológico que se sospecha que contiene adiponectina; y

10 (2) preparar una muestra del fluido biológico obtenido en la etapa previa manteniendo el estado original o llevando a cabo una dilución previa y/o pretratamiento adecuados, poner en contacto la muestra con una suspensión líquida de partículas de látex portadoras de un anticuerpo específico de la adiponectina de PMA en un aparato de análisis automático y analizar ópticamente el grado de aglutinación de las partículas de látex.

15 En el caso de que la adiponectina de PMA contenida en varios fluidos biológicos, tales como sangre, se mida usando un procedimiento de medición convencional tal como radioinmunoensayo o un enzoinmunoensayo, por ejemplo, se necesita una etapa de dilución de una muestra a 500 a 5.000. Por el contrario, en el procedimiento para analizar la adiponectina de PMA de la presente invención se puede realizar una reacción de aglutinación con látex usando un fluido biológico original como muestra, sin dilución previa ni pretratamiento del fluido biológico, por ejemplo, seleccionando adecuadamente el tamaño de partícula de las partículas de látex (por ejemplo, en un caso de adiponectina de PMA en sangre, es preferible un tamaño de partícula de 0,1 a 0,5 μm).

20 En el procedimiento para analizar la adiponectina de PMA de la presente invención se lleva a cabo una reacción de aglutinación usando partículas de látex portadoras de un anticuerpo específico de la adiponectina de PMA (por ejemplo, el reactivo de látex para analizar la adiponectina de PMA de la presente invención) y el grado de aglutinación generado se analiza ópticamente (en particular, se mide) para analizar (en particular, medir) la cantidad de adiponectina de PMA contenida en un fluido biológico (por ejemplo, sangre). El grado de aglutinación de las partículas de látex se puede analizar ópticamente, por ejemplo mediante observación visual o usando un dispositivo óptico para medir la intensidad de la luz dispersada, la absorbancia o la intensidad de la luz transmitida. La longitud de onda de medición es, preferentemente, de 300 a 800 nm. La medición se puede realizar de acuerdo con un procedimiento convencional, seleccionando el tamaño promedio de partícula o la concentración de las partículas de látex usadas o un tiempo de reacción y medir un incremento o una disminución de la intensidad de la luz dispersada, la absorbancia o la intensidad de la luz transmitida. Estos procedimientos se pueden usar en una combinación adecuada de los mismos.

25 En general, la concentración del látex sensibilizado con un anticuerpo específico de la adiponectina de PMA, que está contenida en el sistema para medir una reacción de aglutinación del látex, se puede seleccionar de forma adecuada de acuerdo con la concentración de un aditivo coexistente, tales como sales, proteínas o azúcares. En general, como la concentración en el volumen del líquido final del sistema de reacción, el látex sensibilizado con un anticuerpo específico de la adiponectina de PMA se puede ajustar a, preferentemente, de 0,05 a 10 mg/ml, más preferentemente de 0,1 a 2 mg/ml. Cuando la concentración del látex sensibilizado con un anticuerpo específico de la adiponectina de PMA es demasiado baja, la medición de una reacción de aglutinación a un nivel bajo es, en ocasiones, difícil, y cuando es demasiado alta, la medición de una reacción de aglutinación a un nivel alto es, en ocasiones, difícil, y la reproducibilidad a veces es mala.

35 En la presente invención, la reacción de aglutinación de las partículas de látex se puede medir con más precisión y el intervalo mensurable en un área de nivel bajo y un área de nivel alto se puede expandir adicionalmente, controlando otros factores que influyen sobre la reacción de aglutinación del látex sensibilizado con un anticuerpo específico de la adiponectina de PMA. Los ejemplos de los otros factores que incluyen sobre la reacción de aglutinación del látex incluyen la concentración de las partículas de látex, la cantidad del anticuerpo sensibilizado en las partículas de látex y el tamaño de la partícula de las partículas de látex.

40 Las condiciones para la reacción de aglutinación del látex en el procedimiento para analizar la adiponectina de PMA de la presente invención pueden ser las condiciones habituales y varios tampones se pueden seleccionar aproximadamente como un medio de reacción de acuerdo con el análisis para la adiponectina de PMA en varios fluidos biológicos. En el caso de analizar la adiponectina de PMA en sangre, el tampón no está particularmente limitado, siempre que tenga una fuerza iónica y un pH que no inactive la adiponectina de PMA en sangre y que no inhiba la reacción de aglutinación del látex. Los ejemplos del tampón incluyen tampones de Good, un tampón de glicina y un tampón Tris. El pH de la reacción es, preferentemente, de 5 a 10, más preferentemente de 6 a 8. La temperatura de la reacción es, preferentemente, de 0 a 50 °C, más particularmente de 20 a 40 °C. El tiempo de reacción se puede seleccionar adecuadamente.

55 Ejemplos

La presente invención se ilustrará a continuación adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, que, de ningún modo, son limitantes.

Ejemplo comparativo 1Anticuerpos monoclonales convencionales

Para comparar con el anticuerpo monoclonal de la presente invención se usaron dos anticuerpos monoclonales ANOC9121 y Clone5A, que se preparó mediante inmunización de ratones con un antígeno de adiponectina recombinante expresado en E. coli, como anticuerpos monoclonales convencionales. Las reactividades de estos anticuerpos monoclonales contra la adiponectina humana en sangre se resumen en la Tabla 2. Ambos anticuerpos pudieron detectar de igual forma PMM y PMA en sangre mediante transferencia de Western en condiciones no reductoras. No obstante, en ELISA de tipo sándwich que usan un solo anticuerpo, Clone5A reconoció todas las moléculas en la sangre y ANOC9121 sufrió una ligera reacción cruzada con PMM.

Tabla 1

Anticuerpo	Transferencia de Western		ELISA de tipo sándwich usando un solo anticuerpo
	Reducido	No reducido	
ANOC9121	Se detectó el monómero	Se detectaron PMM y moléculas más grandes	Muy específico de PMA sufrió una ligera reacción cruzada con PMM
Clone5A	No ha reaccionado	Se detectaron PMM y moléculas más grandes	Se detectaron todas las moléculas

Problemas de los anticuerpos monoclonales convencionales (1): Reactividad cruzada con PMM

El kit de ELISA de tipo sándwich preparado anteriormente usando ANOC9121 solo y un kit de ELISA de adiponectina de alto peso molecular disponible comercialmente (FUJIREBIO Inc.), que no necesita pretratamiento, se usaron para medir las fracciones de filtración en gel de dos sueros humanos. La adiponectina total se midió usando un kit de ELISA de adiponectina (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

A menos que se especifique otra cosa, las condiciones para la filtración en gel llevada a cabo en los ejemplos comparativos y los ejemplos de la especificación son las siguientes:

Columna: Superdex 200 prep grade (GE Healthcare Bioscience)
 Fase móvil (disolvente): D-PBS
 Velocidad de bombeo: 1 ml / min
 Marcadores de peso molecular:

- (1) seroalbúmina bovina: 67.000 (Da)
- (2) aldolasa: 158.000
- (3) catalasa: 232.000
- (4) ferritina: 440.000
- (5) tiroglobulina: 669.000
- (6) Dextrano azul 2000: 2.000.000

Los resultados obtenidos usando una muestra de suero con una proporción del contenido de PMM baja se muestran en la FIG. 1 y los resultados obtenidos usando una muestra de suero con una proporción del contenido de PMM alta se muestran en la FIG. 2. En la FIG. 1 y la FIG. 2, A se muestran los resultados del ELISA de tipo sándwich usando ANOC9121, B muestra los resultados del kit de ELISA de adiponectina de peso molecular alto disponible comercialmente (FUJIREBIO Inc.), y C muestra los resultados del kit de ELISA de adiponectina humana (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) para medir la adiponectina total.

Como resultado, tanto el kit de ELISA de ANOC9121 como el kit de ELISA de adiponectina de peso molecular alto disponible comercialmente pudieron medir específicamente la adiponectina de peso molecular alto (A), en el caso de la muestra con un nivel bajo de PPM como se muestra en la FIG. 1. Por el contrario, se observó reactividad cruzada con PMM en ambos kits, en el caso de la muestra con un nivel elevado de PPM como se muestra en la FIG. 2 y este resultado indica la dificultad de una medición específica de PMA.

A este respecto, la fracción de PMA, la fracción de PMM y la fracción de PMB son, respectivamente: una fracción con pesos moleculares mayores que aproximadamente 440 kDa, una fracción con pesos moleculares entre 250 kDa y 440 kDa, y una fracción con pesos moleculares menores que aproximadamente 250 kDa, en las condiciones de filtración en gel mencionadas anteriormente.

Ejemplo comparativo 2

Problemas de los anticuerpos monoclonales convencionales (2): Problema en la preparación del reactivo de látex

Se usó el anticuerpo monoclonal ANOC9121 que tiene una reactividad con el PMM y una especificidad alta por el PMA en el ELISA, para intentar preparar un reactivo de látex.

5 (1) Preparación del reactivo de látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal ANOC9121

10 A 9 ml de un líquido que se preparó mediante disolución del anticuerpo monoclonal ANOC9121 a una concentración de 0,5 mg/ml en un tampón Tris de 0,01 mol/l (pH 8,0) se añadió 1 ml de látex de poliestireno (contenido sólido: 10 % en peso) que tiene un tamaño de partícula promedio de 0,2 μm y se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Adicionalmente se añadió al líquido un tampón Tris (pH 8,0) que contiene 0,5 % en peso de seroalbúmina bovina y después la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos y se centrifugó a 20.000 rpm. El látex se suspendió añadiendo 10 ml de un tampón Tris (pH 8,0) al precipitado obtenido, para preparar un líquido que contiene látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal ANOC9121.

(2) Preparación de tampón

15 Se prepare un tampón mediante la adición de cloruro sódico a una concentración de 0,9 % (% en peso) a un tampón Tris de 0,1 mol/l (pH 8,0) que contiene seroalbúmina bovina a una concentración de 0,5 % (% en peso).

(3) Reactivo de látex para analizar la adiponectina de PMA

Se preparó un reactivo para medir un antígeno de la adiponectina humana usado en este ejemplo comparativo como un reactivo de componente de dos líquidos compuesto por el tampón preparado en (2) como el primer reactivo y el látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal ANOC9121 preparado en (1) como el segundo reactivo.

20 Medición de la adiponectina

(1) Medición de las fracciones de adiponectina

25 A 35 μl de las fracciones de adiponectina de un suero humano (una muestra con un nivel bajo de PMM) se añadieron 90 μl del tampón preparado en (2) y se dejó que las mezclas reposaran a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de tiempo predeterminado. A cada una de las mezclas se añadieron adicionalmente 90 μl del líquido que contiene látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal ANOC9121 preparado en (1) y se agitó. Tras 5 minutos se midió la absorbancias a una longitud de onda de 570 nm. Una variación en la absorbancia durante este periodo se considera la variación de la absorbancia (ΔAbs). Se usó un líquido de antígeno de adiponectina estándar para preparar una curva de calibración basada en los valores de ΔLAbs y las concentraciones del antígeno. El valor de la adiponectina se calculó a partir de la ΔAbs de cada muestra de fracción usando esta curva de calibración. Esta medición se llevó a cabo usando un analizador automático HITACHI de tipo 7170.

30 De forma simultánea a esta medición se midió la adiponectina total usando un kit de látex de adiponectina humana disponible comercialmente (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.). Con respecto a los valores de absorbancia medidos, para comparar entre los picos obtenidos mediante ambos reactivos, los valores de absorbancia medidos usando el reactivo de látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal ANOC9121 se compensaron de forma que los valores de absorbancia de la fracción n.º 109 concordaran entre sí.

Los resultados de la evaluación para las fracciones de adiponectina de un suero humano usando el reactivo de látex que contiene ANOC9121 para analizar la adiponectina de PMA se muestran en la FIG. 3 (E en la FIG. 3).

40 A partir de la comparación con los resultados del reactivo de látex disponible comercialmente para analizar la adiponectina total (D en la FIG. 3), se descubrió que el reactivo de látex usando ANOC9121 para analizar la adiponectina no reaccionaba con las fracciones correspondientes al PMB pero sí reaccionaba con el PMA y el PMM como el reactivo de látex para analizar la adiponectina total. Este resultado muestra que el reactivo de látex que usa ANOC9121 reacciona con el PMM, incluso en el caso de una muestra con un nivel bajo de PMM y no se pudo conseguir el mismo rendimiento que el del ELISA.

45 Como motivo de que el reactivo de látex no exhibiera el mismo rendimiento que el del ELISA, se considera la diferencia en los mecanismos de reacción, es decir, el primer anticuerpo reacciona y, después, el segundo anticuerpo reacciona en el ELISA, mientras que la aglutinación se inicia simultáneamente en un reactivo de látex. También se considera que se debe a una especificidad baja y a una afinidad baja por el PMA.

Ejemplo 1

(1) Preparación de inmunógeno y nuevo anticuerpo monoclonal

50 Los inventores concluyeron que era difícil obtener un anticuerpo monoclonal con una elevada especificidad por PMA mediante el procedimiento de producción del anticuerpo intentado previamente usando una adiponectina

recombinante expresada en *E. coli* y, por tanto, la fracción de PMA individual se aisló de la adiponectina en la sangre humana y se usó para preparar el anticuerpo monoclonal. La adiponectina total en sangre humana se purificó usando una columna unida a ANOC9121 mencionada anteriormente. Esta columna se preparó acoplando de 3 a 10 mg/ml de ANOC9121 purificado con 4 g de Sepharose 4B activada con CNBr. La columna se lavó con un tampón fosfato y se aplicó a la columna de 5 a 20 ml de un suero humano. La columna se lavó con un tampón fosfato para eliminar el exceso de componentes séricos y la adiponectina humana en la sangre se eluyó de la columna con un eluyente. Como el eluyente se puede usar un agente desnaturalizante de proteínas tales como varios mol/l de urea, un ión caotrópico, o una solución de varios mol/l de cloruro sódico y se usaron 6 mol/l de urea en este ejemplo. La adiponectina eluida se aplicó adicionalmente a purificación por filtración en gel para purificar la PMA de la adiponectina humana en sangre recogiendo, no todas las fracciones que contienen PMA, sino las fracciones tempranas solas antes del pico de PMA, es decir solo las fracciones que tienen pesos moleculares superiores al del pico de PMA.

La adiponectina de PMA humana purificada en sangre se usó, junto con adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund, para inmunizar ratones Balb/C en una cantidad de 1 a 10 µg/cuerpo varias veces en semanas alternas. Se extrajeron los bazo de los ratones y las células del bazo se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón P3U1 mediante el procedimiento de polietilenglicol, de acuerdo con un procedimiento convencional, para producir hibridomas.

Para la detección selectiva de los hibridomas obtenidos para un anticuerpo monoclonal con una especificidad elevada por la adiponectina más nativa, la adiponectina contenida en la sangre se usó como adiponectina que no se desnaturalizó nada. Más particularmente, la porción Fc de ANOC9121 se digirió para preparar F(ab')₂ de ANOC9121 y se preparó una placa en la que se inmovilizó F(ab')₂ de ANOC9121. A esta placa con F(ab')₂ se la hizo reaccionar con un suero humano diluido adecuadamente y después se hicieron reaccionar los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas. Un anticuerpo anti-Fc de IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP) se añadió adicionalmente a la placa y se incubó la placa. Tras la incubación, se midió la fuerza del desarrollo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina para obtener Clone8D del hibridoma de ratón que produjo el anticuerpo monoclonal Clone8D que tiene una especificidad alta y una afinidad alta por la adiponectina nativa.

(2) Evaluación del anticuerpo monoclonal recién producido mediante transferencia de Western

El anticuerpo monoclonal anti-adiponectina humana Clone8D, que se preparó usando la fracción de adiponectina de PMA purificada de sangre, se usó para analizar la adiponectina en el organismo humano mediante transferencia de Western. Como muestras, la sangre humana se sometió a electroforesis en condiciones no reducidas y sin calentamiento y en condiciones reducidas con 2-mercaptoetanol, y estas muestras se hicieron reaccionar con los tres anticuerpos mencionados anteriormente ANOC9121, Clone5A, y Clone8D, y se tiñeron. La adiponectina humana en sangre está presente en varias formas tales como PMA, PMM y PMB, en condiciones no reducidas y sin calentar, pero en condiciones reducidas, los multímeros trímeros y superiores desaparecen y la adiponectina está presente en forma monomérica con aproximadamente 28.000 Da o como molécula correspondiente al dímero. El anticuerpo monoclonal ANOC9121 reconoció todas estas formas en condiciones no reducidas y sin calentar y en condiciones reducidas. Por el contrario, el anticuerpo monoclonal Clone5A y el anticuerpo monoclonal Clone8D preparados usando adiponectina humana en sangre no reconocieron el monómero desnaturalizado mediante reducción, pero reconocieron una pluralidad de macromoléculas en condiciones no reducidas y sin calentar. No obstante, siempre que se evaluó mediante transferencia de Western no se observaron diferencias significativas entre los tres anticuerpos monoclonales con respecto a la reactividad con las macromoléculas.

Ejemplo 2

Evaluación del anticuerpo monoclonal recién producido mediante ELISA

Se construyó un ELISA de tipo sándwich usando Clone8D y se comparó con los ELISA de tipo sándwich convencionales con respecto a su especificidad por PMA. Más particularmente, Clone8D diluido a una concentración de 5 a 10 µg/ml con un tampón fosfato se añadió a una placa de ELISA de 96 pocillos disponible comercialmente y se realizó una reacción de inmovilización durante la noche. Esta placa con anticuerpo inmovilizado se bloqueó con un tampón fosfato que contiene de 0,1 to 1 % de seroalbúmina bovina. En la placa con anticuerpo inmovilizado, las fracciones de suero humano que se habían fraccionado mediante HPLC usando una columna Superdex 200 (GE Healthcare) se hicieron reaccionar y, después de lavar, el Clone8D marcado con biotina se hizo reaccionar. Adicionalmente se añadió a la placa estreptavidina conjugada con HRP y se incubó la placa. Tras la incubación, el exceso de estreptavidina conjugada con HRP se eliminó mediante lavado. La fuerza del desarrollo obtenida mediante la adición de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina se midió para determinar la cantidad de adiponectina en cada fracción.

Adicionalmente, las mismas fracciones se midieron usando los kits de ELISA usados en el ejemplo comparativo 1, es decir el kit de ELISA de tipo sándwich usando ANOC9121 solo y el kit de ELISA de adiponectina de peso molecular alto disponible comercialmente (FUJIREBIO Inc.) que no necesita pretratamiento, para confirmar la reactividad cruzada con el PMA. Adicionalmente, el kit de ELISA para adiponectina humana (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) se usó para medir la adiponectina total.

Los resultados se muestran en la FIG. 4 y la FIG. 5. El ELISA de tipo sándwich usando Clone8D (F en la FIG. 4 y la FIG. 5) pudo llevar a cabo una medición específica de PMA son reactividad cruzada con PMM, no solo en el caso de una muestra con un nivel bajo de PMM como se muestra en la FIG. 4, sino también en el caso de una muestra con un nivel alto de PMM como se muestra en la FIG. 5, en contraste con los otros procedimientos de ELISA.

5 Ejemplo 3

Preparación del reactivo de látex para analizar la adiponectina de peso molecular alto usando un anticuerpo monoclonal nuevo

(1) Preparación del reactivo que contiene látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal Clone8D

10 A 9 ml de un líquido que se preparó mediante disolución del anticuerpo monoclonal Clone8D a una concentración de 0,5 mg/ml en un tampón Tris de 0,01 mol/l (pH 8,0) se añadió 1 ml de látex de poliestireno (contenido sólido: 10 % en peso) que tiene un tamaño de partícula promedio de 0,2 μ m y se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Adicionalmente se añadió al líquido un tampón Tris (pH 8,0) que contiene 0,5 % en peso de seroalbúmina bovina y después la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos y se centrifugó a 20.000 rpm. El látex se suspendió añadiendo 10 ml de un tampón Tris (pH 8,0) al precipitado obtenido, para preparar un líquido que
15 contiene látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal Clone8D.

(2) Preparación de tampón

Se prepare un tampón mediante la adición de cloruro sódico a una concentración de 0,9 % (% en peso) a un tampón Tris de 0,1 mol/l (pH 8,0) que contiene seroalbúmina bovina a una concentración de 0,5 % (% en peso).

(3) Reactivo de látex para analizar la adiponectina de PMA

20 Se preparó un reactivo para medir un antígeno de la adiponectina humana usado en este ejemplo como un reactivo de componente de dos líquidos compuesto por el tampón preparado en (2) como el primer reactivo y el látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal Clone8D preparado en (1) como el segundo reactivo.

Medición de la adiponectina

(1) Medición de las fracciones de adiponectina

25 A 35 μ l de las fracciones de adiponectina de un suero humano se añadieron 90 μ l del tampón preparado en (2) y se dejó que las mezclas reposaran a 37 °C durante un periodo de tiempo predeterminado. A cada una de las mezclas se añadieron adicionalmente 90 μ l del líquido que contiene látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal Clone8D preparado en (1) y se agitó. Tras 5 minutos se midió la absorbancias a una longitud de onda de 570 nm. Una variación en la absorbancia durante este periodo se considera la variación de la absorbancia (Δ Abs). Se usó un
30 líquido de antígeno de adiponectina estándar para preparar una curva de calibración basada en los valores de Δ Abs y las concentraciones del antígeno. El valor de la adiponectina se calculó a partir de la Δ Abs de cada muestra de fracción usando esta curva de calibración. Esta medición se llevó a cabo usando un analizador automático HITACHI de tipo 7170.

35 De forma simultánea a esta medición se midió la adiponectina total usando el kit de látex de adiponectina humana disponible comercialmente (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.). Con respecto a los valores de absorbancia medidos, para comparar entre los picos obtenidos mediante ambos reactivos, los valores de absorbancia medidos usando el reactivo de látex sensibilizado con el anticuerpo monoclonal Clone8D se compensaron de forma que los valores de absorbancia de la fracción n.º 109 concordaran entre sí.

40 Los resultados se muestran en la FIG. 6. En la FIG. 6, D muestra los resultados del kit de látex de adiponectina humana disponible comercialmente (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.), y G muestra los resultados del reactivo de látex sensibilizado con el anticuerpo Clone8D de la presente invención. Una reacción de aglutinación del látex específica de PMA se confirmó mediante la medición de las fracciones en filtración en gel de adiponectina sérica humana usando el reactivo de la presente invención.

Aplicabilidad industrial

45 El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar para el análisis de la adiponectina.

NÚMERO DE DEPÓSITO

50 El hibridoma de ratón-ratón Clone8D se depositó en una Autoridad de Depósito Internacional, el International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1 – 1, Higashi 1–chome Tukuba–shi, Ibaraki–ken 305 – 8566 Japón), el 5 de marzo de 2009. El número de depósito es FERM BP–11106.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal **caracterizado porque** reacciona específicamente con adiponectina de peso molecular alto, en donde el anticuerpo es producido por el clon del hibridoma ratón–ratón depositado como FERM BP–11106.
- 5 2. Un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por** el uso de adiponectina de peso molecular alto como antígeno.
3. Un procedimiento *in vitro* para analizar inmunológicamente la adiponectina de peso molecular alto **caracterizado por** el uso del anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el procedimiento es un procedimiento de aglutinación de látex.
- 10 5. Un reactivo para analizar inmunológicamente la adiponectina de peso molecular alto, que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1.
6. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende partículas de látex portadoras del anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1.

Figura 1

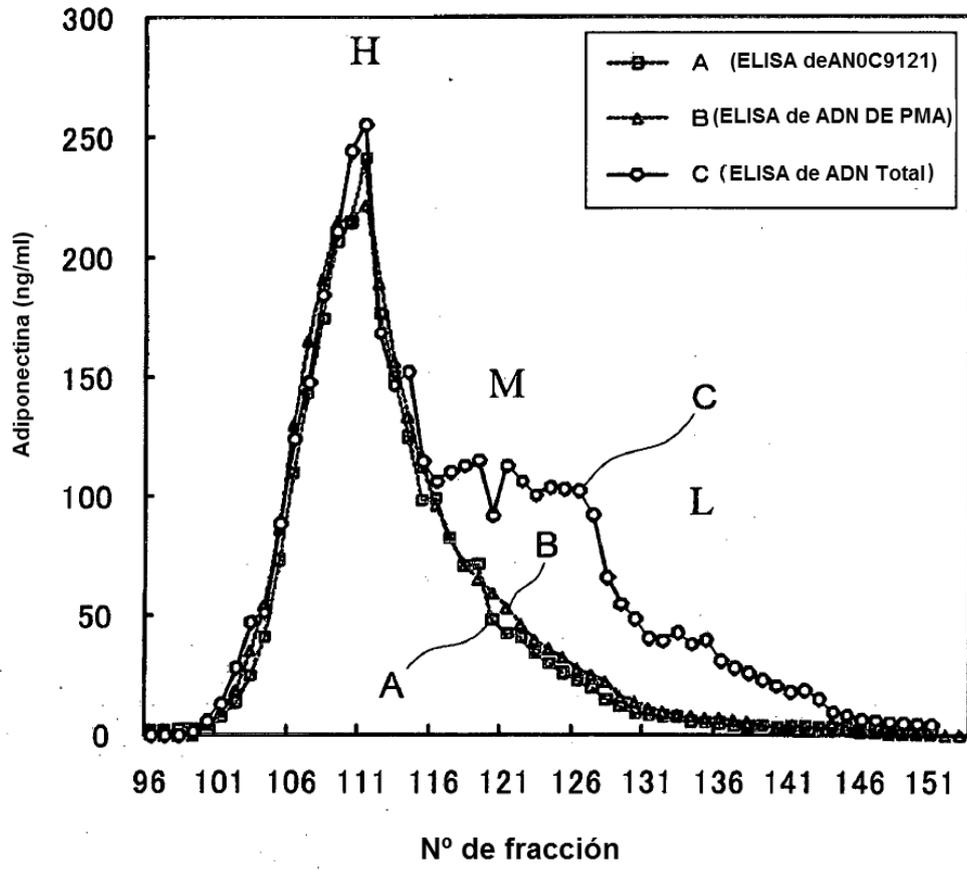


Figura 2

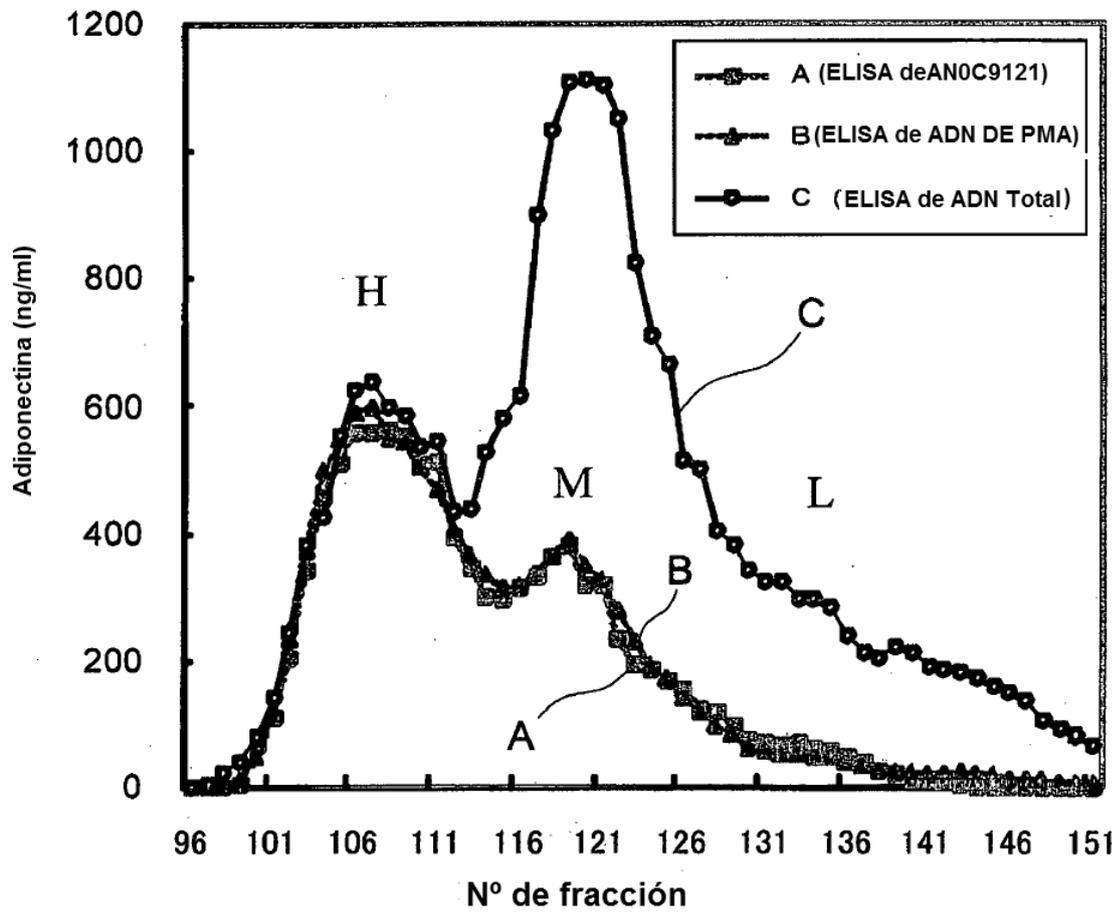


Figura 3

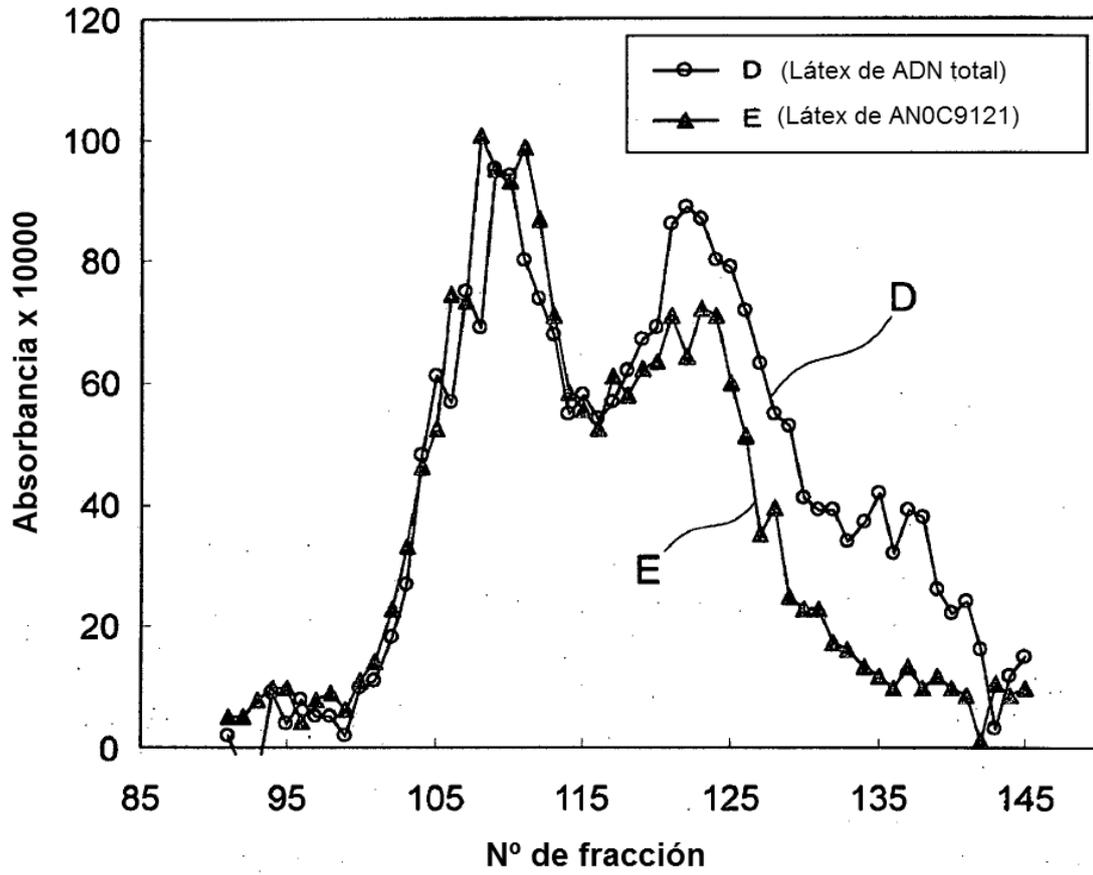


Figura 4

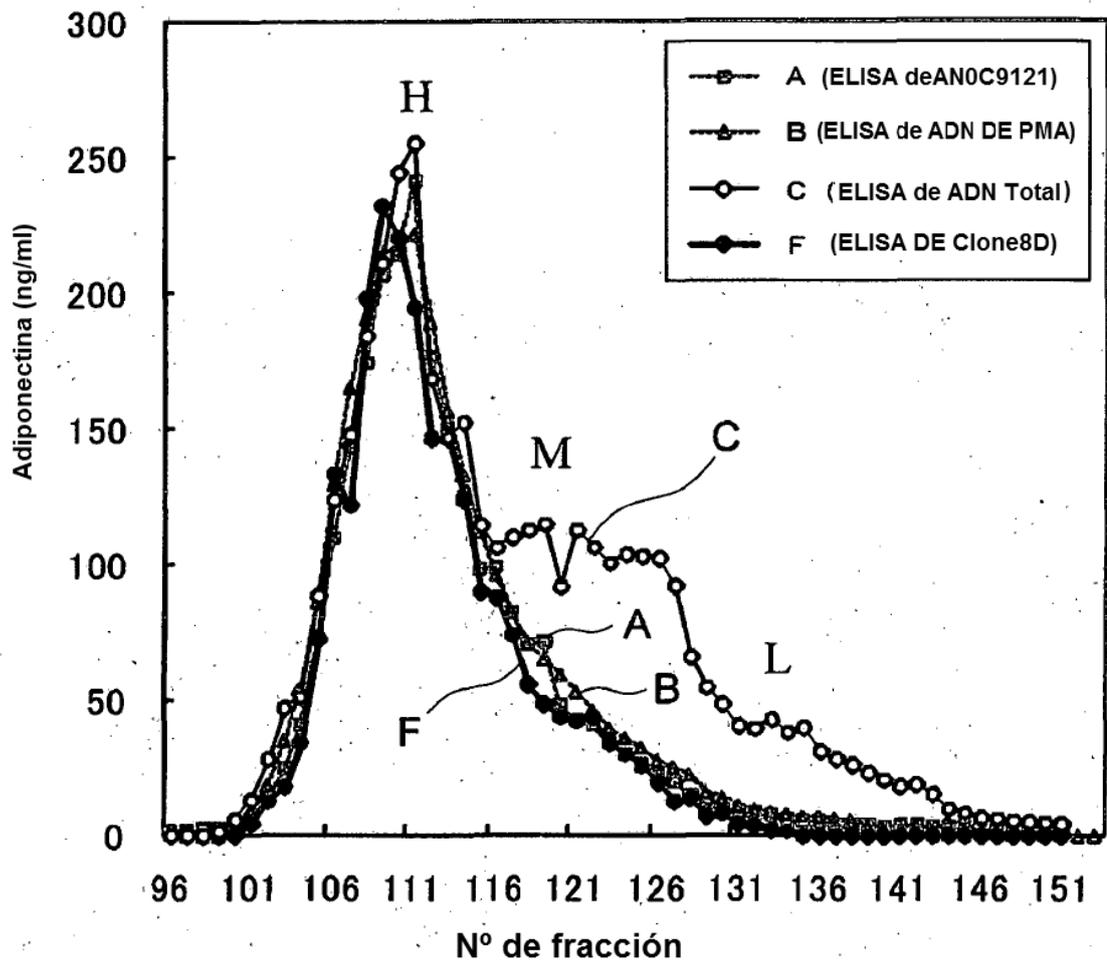


Figura 5

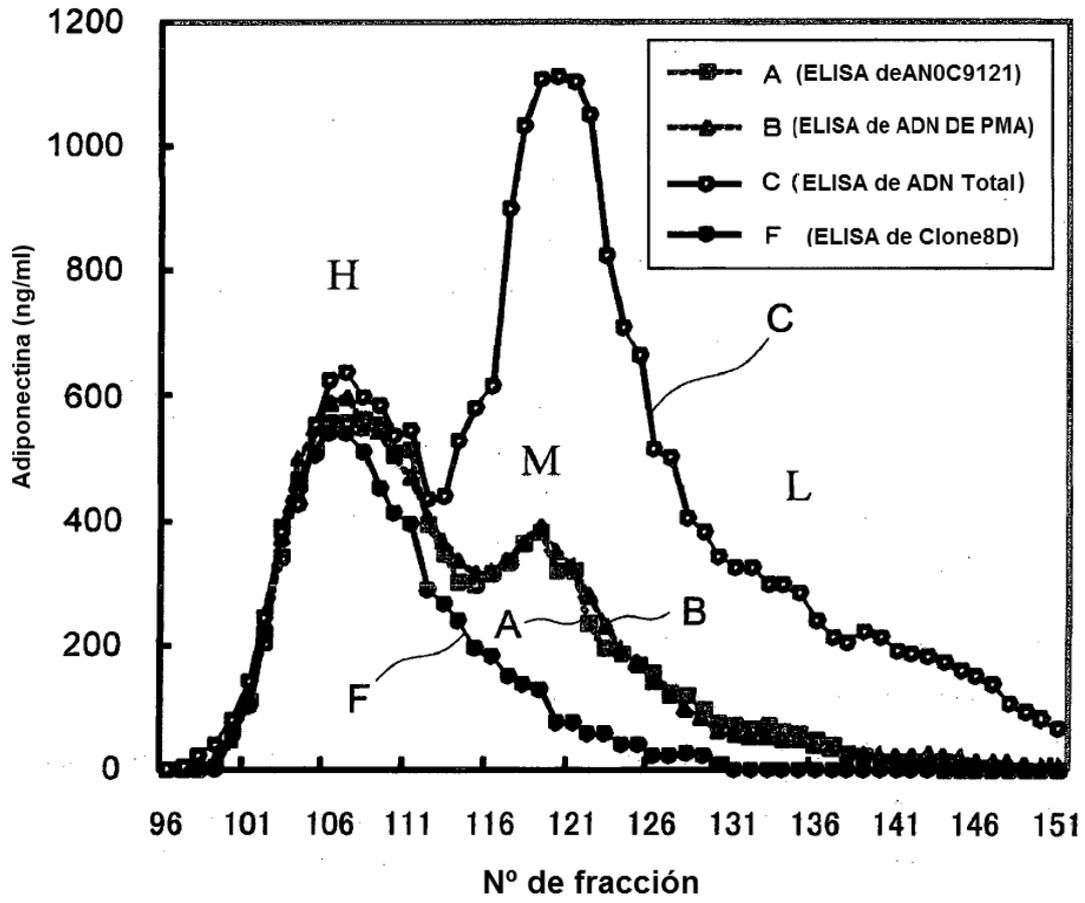


Figura 6

