

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO de radicación  No. 14-049592- -00002-0000 Fecha: 2014-09-03 16:51:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 75
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

☒ Modificación a una Solicitud en trámite

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

&

NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☐

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Japón.	9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome-Chiyoda-ku, 1018535, Japón.	Tokyo
Y	Y	Y
Japón.	5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138510, Japón	Tokyo
Respectivamente	Respectivamente	Respectivamente
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre
De Páez Luz Clemencia

Documento de identificación
C.C. 35.456.344

Tarjeta profesional
T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 14.049.592

Aparece

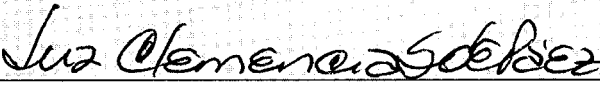
Debe ser

Modificación:

- ☒ **Modificación al capítulo descriptivo.**
Presento nuevo capítulo descriptivo el cual solicito sea tenido en cuenta al momento de realizar el examen.
- ☐ **Modificación al resumen.**
- ☐ **Modificación a los dibujos.**

5. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación por \$128.000.
- ☐ Poder, si fuere el caso.
- ☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555


MMS\IMMS\NCA\ID-AF270927\WPC20893

DESCRIPCIÓN

**MÉTODO PARA EL PRETRATAMIENTO DE UNA MUESTRA BIOLÓGICA
QUE CONTIENE PROTEÍNA**

Campo técnico

[0001]

La presente invención se refiere a un método para el pretratamiento de una muestra biológica en el inmunoensayo de una proteína contenida en la muestra biológica. La presente invención también se refiere a un inmunoensayo para determinar una proteína contenida en una muestra biológica pretratada con el método anterior.

Antecedentes del arte

[0002]

En los últimos años, se ha utilizado un método para medir biomarcadores como método para obtener información útil para el diagnóstico de varias enfermedades. Un "biomarcador" se refiere a "una característica que es objetivamente medida y evaluada como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica". (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP: BIOMARKERS AND SURROGATE ENDPOINTS: PREFERRED DEFINITIONS AND CONCEPTUAL FRAMEWORK, CLIN PHARMACOL THER 2001; 69:89-95). Más específicamente, un

biomarcador es un material de origen biológico contenido en muestras biológicas, por ejemplo, fluidos corporales tales como suero y orina, y tejidos. Un biomarcador se utiliza como indicador para detectar cuantitativamente cambios biológicos *in vivo*.

Para medir los biomarcadores, se utilizan inmunoensayos tales como ELISA (inmunoensayo enzimático), RIA (radioinmunoensayo) e inmunocromatografía. Dichos inmunoensayos se pueden llevar a cabo fácilmente utilizando kits para ensayo.

[0003]

Por otro lado, puede surgir el problema de los falsos positivos y los falsos negativos en la medición de los biomarcadores. En particular, en la medición de una proteína de membrana como biomarcador, debido a que el sitio reconocido por un anticuerpo de detección está cubierto por una membrana, el sitio puede no reaccionar lo suficiente con el anticuerpo. Por consiguiente, los métodos adecuados que utilizan kits para ensayos tal como se ha mencionado anteriormente no pueden detectar un biomarcador con gran precisión, y se desea un método que pueda solucionar este problema.

Resumen de la invención

Problema técnico

[0004]

Un objeto de la presente invención es brindar un método para el pretratamiento de una muestra biológica en el inmunoensayo de una proteína contenida en la muestra biológica, en particular, una proteína de membrana que presenta el problema anterior. Con mayor preferencia, un objeto de la presente invención es brindar un método para el pretratamiento de una muestra biológica que pueda resolver el problema de los falsos positivos y los falsos negativos que posiblemente surjan en el inmunoensayo de una proteína contenida en la muestra biológica, y que pueda aumentar la precisión de la medición y/o la sensibilidad de la medición.

[0005]

Otro objeto de la presente invención es brindar un inmunoensayo para determinar una proteína contenida en una muestra biológica pretratada con el método anterior, en particular, una proteína de membrana.

Solución al problema

[0006]

Cuando una muestra biológica que contiene una proteína como por ejemplo una proteína insoluble, en particular, una proteína de membrana, es sometida a un inmunoensayo utilizando la proteína como biomarcador, la proteína meta a menudo es solubilizada utilizando un surfactante antes del inmunoensayo. Los inventores de la presente realizaron una extensa investigación para solucionar el problema anteriormente mencionado en el inmunoensayo de dichas

muestras biológicas, y hallaron que cuando una muestra biológica que contiene una proteína, en particular, una proteína insoluble como por ejemplo una proteína de membrana, es congelada una vez a una temperatura superior a -80°C , en particular, a -70°C , y luego descongelada, se puede resolver el problema anteriormente mencionado que puede surgir en el inmunoensayo de una proteína, y se puede incrementar la precisión de la medición y/o la sensibilidad de la medición.

[0007]

La presente invención se ha logrado realizando otra investigación basada en este hallazgo. La invención incluye lo siguiente:

[0008]

(I) Métodos para el Pretratamiento de una Muestra Biológica que Contiene una Proteína

(I-1) Un método para el pretratamiento de una muestra biológica en el inmunoensayo de una proteína contenida en la muestra biológica, método que comprende las etapas de:

- (1) congelar la muestra biológica a una temperatura superior a -80°C , en particular, a -70°C o superior;
- (2) descongelar la muestra biológica congelada; y
- (3) solubilizar la muestra biológica utilizando un surfactante.

[0009]

(I-2) Un método para el pretratamiento de una muestra

biológica en el inmunoensayo de una proteína contenida en la muestra biológica, método que comprende las etapas de:

(2') descongelar la muestra biológica congelada a una temperatura superior a -80°C , en particular, a -70°C o superior; y

(3) solubilizar la muestra biológica utilizando un surfactante.

[0010]

(I-3) El método de pretratamiento que se describe en (I-1) o (I-2), donde la muestra biológica es un fluido corporal de un animal que incluye un ser humano.

(I-4) El método de pretratamiento que se describe en (I-3), donde el fluido corporal es orina.

(I-5) El método de pretratamiento que se describe en cualquiera de (I-1) a (I-4), donde el surfactante utilizado en una etapa de solubilización (3) es un surfactante no iónico.

[0011]

(I-6) El método de pretratamiento que se describe en (I-5), donde el surfactante no iónico es polioxietileno (10) octilfenil éter.

(I-7) El método de pretratamiento que se describe en cualquiera de (I-1) a (I-6), donde el inmunoensayo es ELISA.

(I-8) El método de pretratamiento que se describe en cualquiera de (I-1) a (I-7), donde la proteína es una

proteína de membrana.

(I-9) El método de pretratamiento que se describe en (I-8), donde la proteína de membrana es acuaporina.

[0012]

(II) Inmunoensayo de una Proteína Contenida en una Muestra Biológica

(II-1) Un inmunoensayo para determinar una proteína contenida en una muestra biológica, donde la muestra biológica es pretratada con el método que se describe en cualquiera de (I-1) a (I-9).

(II-2) El inmunoensayo que se describe en (II-1), donde la proteína es una proteína de membrana.

(II-3) El inmunoensayo que se describe en (II-1) o (II-2), donde la proteína es acuaporina.

(II-4) El inmunoensayo que se describe en (II-1) a (II-3), que es ELISA.

Efectos ventajosos de la invención

[0013]

La presente invención puede brindar un método para el pretratamiento de una muestra biológica a fin de inducir una respuesta inmune suficiente en el inmunoensayo de una proteína, en particular, una proteína de membrana, contenida en la muestra biológica. Por consiguiente, el método de la presente invención puede medir una proteína de membrana contenida en una muestra biológica con gran precisión y alta

sensibilidad, que no se puede medir con suficiente precisión y/o sensibilidad cuando se mide utilizando inmunoensayos convencionales.

Breve descripción de los dibujos

[0014]

La FIG. 1 presenta la relación entre el gen de AQP2 humana (hAQP2) y cebadores de hAQP2/primer mitad (hAQP2N-F, hAQP2N-R) o cebadores de hAQP2/segunda mitad (hAQP2C-F, hAQP2C-R) utilizados para someter el gen de AQP2 humano (hAQP2) a PCR (Ejemplo de Producción de Referencia 1 (2)).

La FIG. 2 presenta una comparación de la longitud del gen y la región entre las secuencias del plásmido de hAQP2N (86-749) Nos. 1, 2, 3, 5 y 6 y del plásmido hAQP2 de (562-901) Nos. 1, 2, 3, 4 y 6 clonados en el Ejemplo de Producción de Referencia 1 (2) y el gen de AQP2 humana de tipo silvestre.

La FIG. 3 presenta los resultados de SDS-PAGE/tinción con CBB (figura superior) y análisis de transferencia Western de los dos tipos de *Escherichia coli* (Nos. 2 y 8) utilizando un anticuerpo de péptido sintético de AQP2 humana (suero de conejo anti-AQP2 humana, PherMingen) en el Ejemplo de Producción de Referencia 1 (4), donde se utilizaron las muestras pre-IPTG (antes de la inducción), las muestras post-IPTG (después de la inducción) y las fracciones insolubles y las fracciones solubles que se obtuvieron

mediante solubilización de *E. coli* inducido.

La FIG. 4 (1) muestra una vista esquemática de la producción de AQP2 humana marcada con His (hAQP2/His/Sf-9) expresada en células de insecto Sf-9 en el Ejemplo de Producción de Referencia 2, y la FIG. 4 (2) muestra los resultados de su análisis.

La FIG. 5 (A) muestra títulos de anticuerpos del suero (OPP21401-21404) después de la tercera inmunización y el suero control (NRS: suero de conejo normal) contra el inmunógeno (hAQP2/Trx), y la FIG. 5 (B) muestra los títulos de anticuerpos del mismo para hAQP2 expresada en células Sf-9 (hAQP2/Trx/Sf-9) en el Ejemplo de Producción de Referencia 3.

La FIG. 6 (A) muestra títulos de anticuerpos del suero (OPP21401-OPP21404) después de la séptima inmunización y el suero control (NRS: suero de conejo normal) para el inmunógeno (hAQP2/Trx), y la FIG. 6 (B) muestra los títulos de anticuerpos del mismo para hAQP2 expresada en células Sf-9 (hAQP2/Trx/Sf-9) en el Ejemplo de Producción de Referencia 3.

La FIG. 7 muestra los resultados de la examinación de reactividad de los anticuerpos policlonales obtenidos (OPP21401 - OPP21404) y el suero control (NRS: suero de conejo normal) con varios antígenos (hAQP2/Trx, hAQP2/Trx/Sf-9, y Control Trx/His) mediante transferencia Western en el Ejemplo de Producción de Referencia 3.

La FIG. 8 muestra los resultados de la examinación de reactividad de los anticuerpos policlonales obtenidos (OPM21401, OPM21402) y el suero control (MMS: suero de ratón normal) con varios antígenos (hAQP2/Trx, hAQP2/Trx/Sf-9, y Control Trx/His) mediante transferencia Western en el Ejemplo de Producción de Referencia 4.

La FIG. 9 muestra los resultados de la examinación de las condiciones que no afectan el sistema de ensayos y bajo las cuales AQP2 es solubilizada de la membrana utilizando varios solubilizantes (Urea, Triton X-100, NP-40, Tween-20, clorhidrato de guanidina (GuCl), y SDS) en el Ejemplo Experimental 1(1) (1-1).

La FIG. 10 muestra los resultados de la examinación de los estabilizantes (Urea, Triton X-100, NP-40, Tween-20, clorhidrato de guanidina (GuCl), y SDS) agregados al primer buffer (0,2% BSA/10 mM EDTA/0,2 M Tris-HCl (pH 8,0)) en el Ejemplo Experimental (1) (1-2).

La FIG. 11 muestra curvas estándares obtenidas mediante ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal (OPM21401) y utilizando, como proteínas estándares de referencia, "la proteína AQP2 fusionada a Trx (AQP2/Trx)" producida a través del método que se describe en el Ejemplo de Producción de Referencia 1 y "AQP2/Sf9" producida a través del método que se describe en el Ejemplo de Producción de Referencia 2 (Ejemplo Experimental 1 (1) (1-4)). La proporción de dilución que se muestra en la abscisa superior indica que se diluyó

una solución concentrada (lisado AQP2/Sf9) preparada suspendiendo AQP2/Sf9 en PBS y solubilizando la AQP2/Sf9 suspendida con igual volumen de solubilizante, con un factor de 2K a un factor de 1458K (es decir, de 2 a 1458 x 1000 veces).

La FIG. 12 muestra los resultados del ELISA utilizando 4 muestras de orina diluidas en serie de voluntarios humanos sanos (Nos. 4, 5, 6 y 9) como muestras de prueba, versus una curva estándar de la proteína estándar (proteína AQP2 fusionada a Trx) (Ejemplo Experimental 1 (1), (1-5)).

La FIG. 13 (A) muestra los resultados de la medición de la cantidad de AQP2 humana en muestras de orina de 10 voluntarios humanos sanos utilizando el anticuerpo monoclonal (OPM21401) para la AQP2 humana (Ejemplo de Producción de Referencia 3) mediante transferencia Western. La FIG. 13 (B) muestra la cantidad de AQP2 humana en muestras de orina de los mismos 10 voluntarios humanos sanos medidas con el sistema ELISA (Ejemplo Experimental 1 (1) (1-6)).

La FIG. 14 muestra una curva de calibración estándar obtenida a través de ELISA que utiliza, como proteína estándar, "AQP2/Sf9" producida a través del método que se describe en el Ejemplo de Producción de Referencia 2.

La FIG. 15 muestra los resultados de la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta prueba en el Ejemplo Experimental 2.

La FIG. 16 muestra los resultados de la medición de la cantidad de AQP2 en orina humana congelada a 20 ± 5 °C durante 0 a 56 días, utilizando el ELISA de AQP2 humana establecido en el Ejemplo Experimental 1 e investigando la relación entre el período de congelamiento y la cantidad de AQP2 en la orina humana (Ejemplo Experimental 3).

La FIG. 17 muestra los resultados de la medición de la cantidad de AQP2 en muestras de orina (Nos. 1 y 2) que se obtuvieron de dos personas sanas y que se conservaron en la oscuridad durante 2 semanas (14 días) en cada una de las diferentes temperaturas (-80 °C, -30 °C, -28 °C, -26 °C, -20 °C, 4 °C) utilizando el ELISA de AQP2 humana establecido en el Ejemplo Experimental 1, e investigando la relación entre la temperatura de congelamiento y la cantidad de AQP2 en orina humana (Ejemplo Experimental 3).

Descripción de las modalidades

[0015]

(I) Método para el Pretratamiento de una Muestra Biológica que Contiene una Proteína

El método de la presente invención es un método para el pretratamiento para una muestra biológica en el inmunoensayo de una proteína contenida en la muestra biológica.

[0016]

El inmunoensayo que se utiliza en la presente se refiere a un método de prueba bioquímico para determinar la presencia o cantidad de una sustancia meta (una proteína en

la presente invención) en una muestra de prueba utilizando la reacción entre un antígeno y un anticuerpo. Los ejemplos de inmunoensayos incluyen, sin carácter limitativo, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo por inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA), aglutinación, nefelometría, turbidimetría, y transferencia Western. Se prefiere ELISA.

[0017]

La muestra biológica meta de la presente invención no está particularmente limitada en cuanto a la fuente y el tipo, siempre y cuando la muestra contenga una proteína y se pueda someter a inmunoensayo. Por ejemplo, se pueden emplear muestras biológicas obtenidas de animales o plantas.

[0018]

Si bien el tipo de animal fuente no está particularmente limitado, preferentemente se pueden utilizar mamíferos, incluidos los seres humanos. Los ejemplos de mamíferos que no son seres humanos incluyen, ratas, ratones, conejillos de India, conejos, monos, perros, vacas, caballos, y similares. Preferentemente, los seres humanos constituyen el animal fuente. Las muestras biológicas obtenidas de dichos animales incluyen, por ejemplo, las siguientes, y cada una contiene una proteína, preferentemente, una proteína de membrana: fluidos corporales tales como orina, sangre, saliva, transpiración, moco, linfa, fluido amniótico y fluido cerebroespinal; y

células y tejidos.

[0019]

Si bien el tipo de planta fuente no está particularmente limitado, los ejemplos de plantas incluyen plantas superiores tales como plantas de semilla y helechos, y plantas inferiores tales como hongos, líquenes y algas. Los ejemplos específicos de muestras biológicas obtenidas de dichas plantas incluyen varias partes de las plantas (incluidos sus productos procesados, por ejemplo, extractos), tales como hojas, tallos, raíces, flores, semillas, frutos, y cáscaras de los frutos; secreciones tales como jugos; y células y tejidos.

[0020]

La muestra biológica es, preferentemente, una muestra obtenida de un mamífero, con particular preferencia, una muestra biológica humana. Para facilitar la toma de muestras, se prefieren mayormente orina, saliva y sangre de mamíferos, en particular, de seres humanos. En particular, se prefiere la orina.

[0021]

Las muestras biológicas pueden ser recién obtenidas o pueden mantenerse durante cierto período después de la toma de muestras, es decir, tomadas y almacenadas durante cierto período, siempre y cuando no ocurra la degradación o el deterioro de la calidad, tal y como la desactivación de la proteína a ser medida.

[0022]

El método de toma de una muestra biológica no está particularmente limitado, siempre y cuando el método no afecte la proteína meta, preferentemente, la proteína de membrana, contenida en la muestra biológica.

[0023]

Además, la muestra biológica tomada se puede someter al método de la presente invención tal como se encuentra. Alternativamente, una parte que contiene la proteína meta se puede extraer o fraccionar de la muestra biológica recogida y el extracto se puede someter al método de la presente invención.

[0024]

La proteína meta de la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando sea una proteína contenida en animales o plantas, tal como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, la proteína meta es, preferentemente, una proteína de membrana. La proteína de membrana es una proteína que existe en una membrana celular o una membrana vesicular. Los ejemplos de proteínas de membrana incluyen, sin carácter limitativo, proteínas transportadoras de membrana, bombas Na^+/K^+ y canales iónicos. Por ejemplo, la proteína de membrana es preferentemente acuaporina (Acuaporina: AQP), con particular preferencia AQP2, que es uno de los 13 tipos de AQPs humanas (ver "Cell Membrane Water Channel, Aquaporin" The Medical

Association of Nippon Medical School, 2009; 5 (2)).

[0025]

La AQP es una de las proteínas de membrana principales que pertenecen a la familia de las PIM (principales proteínas intrínsecas) (Agre P (2006), "The aquaporin water channels", Proc Am Thorac Soc 3 (1): 5-13; Agre P, et al., (1993), "Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel" Am. J. Physiol. 265: (4 Pt 2) F463-76). La acuaporina existe en las membranas luminales del conducto colector y es un canal de agua que se desplaza entre la superficie de la membrana celular y la membrana vesicular intracelular. La acuaporina transporta selectivamente sólo agua y, por lo tanto, se refiere a la absorción de agua celular (Gonen T, WalzT (2006), "The structure of aquaporins", Q. Rev. Biophys. 39 (4): 361-96). La secuencia de aminoácidos de la acuaporina es conocida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la AQP2 humana fue registrada en el GenBank bajo el número de acceso AAB319999.1 (GI:685001) (SEQ ID NO: 1), y la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos fue registrada en el GenBank bajo el número de acceso AH 007818.3 (GI:14190630).

[0026]

Una característica del método de la presente invención es que el método comprende las siguientes etapas:

- (1) congelar la muestra biológica a una temperatura superior a -80 °C, en particular, -70 °C o superior

(etapa de congelamiento);

- (2) descongelar la muestra biológica congelada (etapa de descongelamiento); y
solubilizar la muestra biológica utilizando un surfactante (etapa de solubilización).

[0021]

Cada etapa se describe a continuación.

(1) Etapa de congelamiento

Esta es una etapa de congelamiento de la muestra biológica a una temperatura superior a -80°C .

[0028]

El método de congelamiento no está particularmente limitado, siempre y cuando el método no afecte adversamente la proteína contenida en una muestra biológica, y la muestra biológica meta se puede congelar a una temperatura superior a -80°C . La muestra biológica se puede congelar típicamente utilizando un congelador que puede realizar el congelamiento a la temperatura anteriormente mencionada (temperatura del congelador: superior a -80°C).

[0029]

La temperatura del tratamiento de congelamiento no está particularmente limitada, siempre y cuando sea superior a -80°C tal como se ha descrito anteriormente. La temperatura es, preferentemente, -70°C o superior, con mayor preferencia, -50°C o superior, específicamente, entre -50°C y -10°C , incluso con mayor preferencia, -40°C o

superior, y específicamente, entre -40°C y -10°C . Con mayor preferencia aun, la temperatura es superior a -40°C , específicamente, superior a -40°C e inferior a -10°C , más específicamente, oscila entre -35°C y -15°C , y con particular preferencia, entre -30°C y -20°C .

[0030]

La muestra biológica congelada se puede someter a una etapa de descongelamiento posterior (2) inmediatamente después de la etapa (1). Alternativamente, la muestra biológica congelada una vez congelada se puede mantener en estado congelado durante cierto período. Si bien el período durante el cual se mantiene la muestra en estado congelado no está particularmente limitado, se prefiere entre 1 hora y 1 semana, con mayor preferencia, entre 12 horas y 24 horas.

Los resultados de los Ejemplos Experimentales descritos más adelante indican que el congelamiento de una muestra biológica durante cierto período o más puede estabilizar el valor del inmunoensayo de una proteína obtenida de la muestra biológica. Por consiguiente, para cuantificar la proteína contenida en una muestra biológica con gran precisión, se prefiere que la muestra biológica sea mantenida en estado congelado durante cierto período o más, preferentemente, durante aproximadamente 2 semanas o más. Las condiciones de temperatura de congelamiento para mantener la muestra biológica en estado congelado durante aproximadamente 2 semanas oscilan, por ejemplo,

preferentemente entre -30 °C y -20 °C.

[0031]

(2) Etapa de descongelamiento

Esta es una etapa de descongelamiento de la muestra biológica congelada en la etapa anterior.

[0032]

El método de descongelamiento no está particularmente limitado, siempre y cuando el método no afecte adversamente la proteína contenida en una muestra biológica y pueda descongelar la muestra biológica. Los ejemplos específicos de dichos métodos incluyen, sin carácter limitativo, un método que permite que una muestra biológica congelada que se encuentra en un recipiente repose a temperatura ambiente, un método de aplicación de agua corriente, un método de inmersión en agua y un método de descongelamiento gradual sobre hielo.

[0033]

Los tratamientos de congelamiento y descongelamiento que se han descrito anteriormente en los puntos (1) y (2) se pueden realizar una vez, o repetirse más de una vez. Dada la eficacia del tratamiento, cada uno de los tratamientos de congelamiento y descongelamiento habitualmente se realizan una vez. Sin embargo, tal como se describe en el Ejemplo Experimental que aparece más adelante, la repetición de los tratamientos de congelamiento y descongelamiento no deteriora significativamente los resultados del inmunoensayo

y parece no afectar adversamente la proteína que se medirá. Por lo tanto, la repetición del congelamiento y descongelamiento múltiples veces no se ve limitada. Por consiguiente, cuando se desconoce si se ha efectuado el tratamiento de congelamiento, por ejemplo, cuando no se puede confirmar si la muestra biológica que será sometida a inmunoensayo ha sido congelada a una temperatura superior a -80°C , en particular, a -70°C o superior, se puede realizar nuevamente un congelamiento y descongelamiento.

[0034]

Alternativamente, cuando una muestra biológica previamente sometida a la etapa (1) está disponible (por ejemplo, cuando se obtiene una muestra sometida a la etapa (1) por un tercero), la presente invención se puede llevar a cabo realizando la siguiente etapa (2') en lugar de las etapas (1) y (2):

(2') descongelar una muestra biológica congelada a una temperatura superior a -80°C , en particular, a -70°C o superior.

[0035]

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención brinda un método de pretratamiento de una muestra biológica que comprende la etapa de descongelamiento (2') anterior, y la etapa de solubilización (3). Como temperatura de congelamiento y tiempo de congelamiento de la etapa (2'), se pueden emplear las mismas condiciones mencionadas

anteriormente en los párrafos [0029] y [0030].

[0036]

(3) Etapa de solubilización

Ésta es una etapa de solubilización de una muestra biológica que contiene una proteína que será sometida a inmunoensayo, utilizando un surfactante.

[0037]

La solubilización en esta etapa no está particularmente limitada en cuanto al momento de adición de un surfactante, siempre y cuando una proteína, en particular, una proteína de membrana contenida en una muestra biológica, sea solubilizada. Por ejemplo, el surfactante se puede agregar durante el descongelamiento de una muestra biológica o con posterioridad a él. Si el congelamiento y el descongelamiento no afectan la acción solubilizante del surfactante y el surfactante no tiene influencia en los efectos del congelamiento y el descongelamiento, el surfactante se puede agregar a la muestra biológica antes del congelamiento.

[0038]

El surfactante utilizado en la presente invención se utiliza, generalmente, para solubilizar una proteína, en particular, una proteína de membrana. Por ejemplo, preferentemente se puede utilizar un surfactante no iónico que tiene un excelente efecto solubilizante de proteínas y que no afecta los resultados del inmunoensayo. Los ejemplos

de surfactantes no iónicos preferidos incluyen polioxietileno octilfenil éter y polioxietileno sorbitán monoésteres de ácido graso. Los ejemplos de polioxietileno octilfenil éteres preferibles incluyen polioxietileno(8) octilfenil éter (Triton X-114), polioxietileno(9) octilfenil éter (NP-40), y polioxietileno(10) octilfenil éter (Triton X-100). Se prefiere mayormente el polioxietileno(10) octilfenil éter (Triton X-100).

[0039]

Los ejemplos de polioxietileno sorbitán monoésteres de ácido graso preferibles incluyen polioxietileno sorbitán monolauratos (en particular, polioxietileno(20) sorbitán monolaurato (Tween 20)), polioxietileno sorbitán monopalmitatos (en particular, polioxietileno(20) sorbitán monopalmitatos (Tween 40)), polioxietileno sorbitán monoestearatos (en particular, polioxietileno(20) sorbitán monoestearato (Tween 60)), y polioxietileno sorbitán monooleatos (en particular, polioxietileno(20) sorbitán monooleato (Tween 80)). Entre estos, se prefieren los polioxietileno sorbitán monolauratos, y en particular, se prefiere el polioxietileno(20) sorbitán monolaurato (Tween 20).

[0040]

Todos estos surfactantes están disponibles comercialmente y se pueden adquirir, por ejemplo, de Wako Pure Chemical Industries, Ltd., y Nacalai Tesque, Inc.

[0041]

La cantidad de surfactante agregada a la muestra biológica que contiene una proteína en la etapa de solubilización puede variar de acuerdo con el tipo de surfactante empleado. Por ejemplo, el surfactante se puede agregar en una cantidad adecuada para lograr una concentración del surfactante del 0,0001 al 30% en peso, preferentemente, del 0,01 al 10% en peso, y con particular preferencia, del 0,1 al 2% en peso, por cada 100% en peso de muestra biológica que se desea tratar. En otras palabras, la cantidad de surfactante oscila entre 0,01 y 30000 partes en peso, preferentemente, entre 10 y 10000 partes en peso, y con mayor preferencia, entre 100 y 2000 partes en peso por cada 100 partes en peso de la cantidad total de la proteína contenida en la muestra biológica.

[0042]

Las condiciones para la etapa de solubilización no están particularmente limitadas, siempre y cuando la proteína meta, en particular, la proteína de membrana, se pueda disolver sin que pierda la actividad inmunológica que se desea medir. Sin embargo, las condiciones son típicamente un pH de 4 a 10, preferentemente, un pH de 6,5 a 8,5, y una temperatura de 0 a 50 °C, y preferentemente, de 4 a 37 °C.

[0043]

La muestra biológica obtenida al someterla a las etapas

(1) a (3) o las etapas (2') y (3) se puede someter al inmunoensayo que se describe más abajo tal como se encuentra o después de ser sometida a una separación sólido-líquido o fraccionamiento, de ser necesario.

[0044]

(II) Inmunoensayo de la Proteína Contenida en la Muestra Biológica

La presente invención se refiere a un inmunoensayo para determinar una proteína, en particular, una proteína de membrana, contenida en una muestra biológica pretratada en la etapa (I) anterior. El inmunoensayo que se utiliza en la presente incluye tanto métodos para la detección cualitativa de una proteína contenida en una muestra biológica, como métodos para la detección cuantitativa de una proteína contenida en una muestra biológica.

[0045]

El inmunoensayo que se utiliza en la presente incluye el inmunoensayo enzimático (EIA), el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la aglutinación, la nefelometría, la turbidimetría y la transferencia Western convencionales. Estos métodos se pueden seleccionar adecuadamente de acuerdo con el propósito. Se prefiere ELISA.

[0046]

Todos los inmunoensayos anteriores son métodos convencionales conocidos en el arte, y se pueden llevar a

cabo fácilmente de acuerdo con (o según) libros de texto y documentos tales como Eiji ISHIKAWA, "Enzaimu imunoassei wa ko kaihatsu suru (This is How an Enzyme Immunoassay is Developed)", Gakkai shuppan senta, Julio de 2003. Por motivos de conveniencia, los productos disponibles comercialmente se pueden utilizar como anticuerpos (anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales) empleados en dichos inmunoensayos. Cuando no están disponibles, dichos anticuerpos se pueden preparar de acuerdo con (o según) libros de texto o documentos tales como "Tanpakushitsu jikken handobukku: bunri seisei shitsuryo bunseki kotai sakusei bunshikan sogo sayo kaiseki nado no kihon genri to saishin purotokoru soshuhen (Protein Experiment Handbook - Basic Principles and Current Protocols of Separation/Purification, Mass Spectrometry, Antibody Production, Molecular Interaction Analysis)", summary of the full version, Yodosha Co., Ltd., August, 2003).

[0047]

Una modalidad preferida de la presente invención es un inmunoensayo que utiliza, como muestra meta, una muestra biológica obtenida de humanos sometida al pretratamiento de la presente invención, en particular, orina, y que determina la cantidad de una proteína contenida en la muestra biológica, por ejemplo, una proteína de membrana como por ejemplo acuaporina (AQP), preferentemente AQP2 humana, tal como se muestra en los Ejemplos Experimentales.

[0048]

El ensayo ELISA se utiliza preferentemente como inmunoensayo. Por ejemplo, el anticuerpo para AQP utilizado en ELISA se puede producir a través de un método estándar, o con referencia a los Ejemplos de Producción de Referencia 2 y 3 que se describen más adelante. El ensayo ELISA que utiliza orina como muestra de prueba se puede llevar a cabo de acuerdo con el protocolo que se describe en el Ejemplo Experimental 1 que se describe más adelante. Tal y como se describe en el Ejemplo Experimental 2, el pretratamiento de la presente invención permite una detección altamente precisa y eficaz de la cantidad de proteína de membrana, como por ejemplo AQP, contenida en la orina.

[EJEMPLOS]

[0049]

A continuación, se describirá una configuración de la presente invención y sus efectos en base a los Ejemplos de Producción de Referencia y los Ejemplos Experimentales. Sin embargo, la presente invención de ningún modo se limita a dichos Ejemplos Experimentales y similares.

[0050]

Ejemplo de Producción de Referencia 1: Producción de AQP humana fusionada a Trx/His expresada en *E. coli*

Se clonó el gen de acuaporina humana 2 (AQP2) y se expresó en *E. coli*. La proteína AQP2 humana es una proteína transmembrana cinco que está compuesta por 271 aminoácidos,

y cuyo dominio de proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kD (Sasaki S, et al., Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct. Clin. Invest.. 1994; 93(3): 1250-1256.). Aquí, la proteína AQP2 humana se expresó en *E. coli* en un estado que tiene su extremo N marcado con Trx.

[0051]

El método se resume de la siguiente manera.

[0052]

Primero, el gen correspondiente a la AQP2 humana (271 aminoácidos) se dividió en dos partes a ser sometidas a clonación PCR utilizando un par de cebadores de primera mitad y un par de cebadores de segunda mitad. Los productos de PCR fueron incorporados, cada uno, a un plásmido, los plásmidos se transformaron en *E. coli*, y se determinaron sus secuencias de ácidos nucleicos. Luego, se seleccionaron el clon 1 (primera mitad) y el clon 4 (segunda mitad) que tenían la misma secuencia que la de un tipo silvestre, escindidos en un sitio de enzima de restricción común superpuesto (BamHI) y las partes correspondientes se ligaron con una ligasa para obtener una secuencia de genes. Luego, la secuencia de genes de AQP2 se insertó en un vector de expresión de proteína fusionada al marcador His, para obtener un vector de expresión de AQP2 fusionada al marcador His (clon 8). Sin embargo, dado que no expresó la proteína AQP2 en forma suficiente, se extrajo el fragmento de ácido

nucleico NcoI-BamHI que carecía de extremo N terminal y se lo incorporó a un vector de fusión a Tiorredoxina (Trx). El vector de expresión de AQP2 fusionada a Trx (clones 2 y 8) se introdujo en *E. coli* y cuando se realizó la inducción utilizando IPTG, se descubrió que una proteína AQP2 fusionada a Trx se expresaba en gran cantidad.

[0053]

Esta proteína AQP humana fue confirmada utilizando un anticuerpo producido con péptidos de extremo C terminal humanos sintéticos disponibles comercialmente.

[0054]

(1) Amplificación por PCR y clonación del gen de AQP2 humana

El gen de AQP2 humana fue amplificado por separado como una primera mitad (AQP2N: 86-749) y una segunda mitad (AQP2C: 562-901) a partir de una biblioteca de ADNc humano (QUICK-Clone cDNA Human cDNA, CLONTECH) utilizando cebadores específicos para ello.

[0055]

Específicamente, tal y como se muestra en la FIG. 1, la PCR del gen de AQP2 humana se realizó dividiendo la región (86-901) que codifica la proteína de AQP2 humana (271 aminoácidos) en el sitio HindIII (posición 609) en dos partes, es decir, una parte N terminal y una parte C terminal. Como cebadores de PCR para la parte N terminal del gen de AQP2 humana (hAQP2/primeras mitad, denominada "hAQP2N" en adelante), se utilizaron 22 bases desde el codón de

inicio como cebador directo (hAQP2N-F: SEQ ID NO. 2) y se utilizaron 22 bases de 728-749 como cebador inverso (hAQP2N-R: SEQ ID NO. 3). Por otro lado, con respecto a la parte C terminal del gen de AQP2 humana (hAQP2/segunda mitad, denominada "hAQP2C" en adelante), se utilizaron 22 bases de 562-583 como cebador directo (hAQP2C-F: SEQ ID NO. 4), y se utilizaron 21 bases (881-901) hasta el codón de parada como cebador inverso (hAQP2C-R: SEQ ID NO. 5). Para cada uno de los extremos 5' de hAQP2N-F y hAQP2C-R, se agregó un sitio de enzima de restricción (hAQP2N-F: SphI, hAQP2C-R: BamHI) a ser utilizado para la inserción en el vector de expresión. La FIG. 1 muestra el gen de AQP2 y la configuración de los cebadores para la primera mitad y la segunda mitad. Como resultado de la PCR, se obtuvieron productos de PCR de 884 bp (parte hAQP2N) y 340 bp (parte hAQP2C) que habían sido calculados.

[0056]

El producto de PCR de AQP2N (86-749) fue incorporado en un vector de clonación pT7, que se transformaría en *E. coli*, a través de lo cual se obtuvieron las colonias de *E. coli* Nos. 1, 2, 3, 5, y 6. Los ADNs de plásmido se extrajeron de estas colonias de *E. coli* que serían sometidas a PCR utilizando los cebadores de primera mitad específicos (NF/NR). Como resultado, se confirmó que la secuencia de AQP2N deseada (86-749) se insertó en las colonias de *E. coli* Nos. 1, 3 y 5. Además, dos tipos de enzimas de restricción

actuaron en los cinco tipos de plásmidos para cortarlos en fragmentos. Luego, se confirmó que los fragmentos de ácido nucleico tenían tamaños derivados del gen de AQP2.

[0057]

De un modo similar, también se amplificó AQP2C (562-901), utilizando los cebadores de segunda mitad específicos, las colonias de *E. coli* Nos. 1 a 6 fueron examinadas y se halló que el gen había sido insertado en todas las colonias. Los plásmidos de las colonias, excluido el No. 5, es decir, los Nos. 1, 2, 3, 4 y 6 fueron extraídos y los tamaños de los genes insertados fueron examinados también utilizando dos enzimas de restricción. El tamaño del fragmento de ácido nucleico extraído por las enzimas de restricción de los cinco tipos de plásmidos fue de 2200 bp, tal como había sido calculado. Por lo tanto, se juzgó que el gen que incluía AQP2C (562-901) estaba incorporado en los plásmidos.

[0058]

Se determinaron 10 tipos de secuencias de ácidos nucleicos en total, que son aquellas de los plásmidos de AQP2N (86-749) Nos. 1, 2, 3, 5 y 6 y los plásmidos de AQP2C (562-901) Nos. 1, 2, 3, 4 y 6, utilizando el CEQ2000 de Beckman-Coulter. Luego, se compararon las secuencias de ácidos nucleicos de los plásmidos con una secuencia correspondiente de tipo silvestre (FIG. 2). Como podemos observar en la FIG. 2, se seleccionaron el plásmido de AQP2N (86-749) No. 1 y el plásmido de AQP2C (562-901) No. 4, que

tienen la misma secuencia que la del tipo silvestre, y se determinó crear un vector de expresión ligando fragmentos de ambos plásmidos.

[0059]

(2) Construcción del vector de expresión de AQP2 humana
fusionada al marcador His

Se extrajo un fragmento SphI-BamHI del plásmido de AQP2N (86-749) No. 1, y se extrajo un fragmento BamHI-HindIII del plásmido de AQP2C (562-901) No. 4. Luego, los dos fragmentos fueron incorporados, utilizando ligasa, a un vector de expresión de fusión con el marcador His (pGL80L) cuyo anillo se abrió en los sitios SphI e HindIII. La PCR de las colonias se llevó a cabo utilizando el par de cebadores F2/R y se confirmó que los fragmentos fueron insertados en las colonias de *E. coli* No. 2 y No. 8.

[0060]

Los plásmidos se extrajeron de las colonias de *E. coli* No. 2 y No. 8 y fueron examinados para determinar si estaban presentes fragmentos de ácido nucleico que tenían tamaños prescriptos (SphI-HindIII: 664 bp, SphI-BamHI: 514 bp, BamHI-HindIII: 340 bp) utilizando dos tipos de enzimas de restricción específicas para el gen de AQP2. Como resultado, se hallaron los mismos fragmentos de ácido nucleico en el No. 8 y se confirmó que el gen de AQP2 estaba inserto allí. El No. 8 fue examinado nuevamente para confirmar la secuencia de ácido nucleico, utilizando el CEQ2000 de

Beckman-Coulter, y se confirmó que no hubo sustituciones o deleciones en la secuencia de ácido nucleico.

[0061]

(3) Construcción del vector de expresión de AQP2 deficiente de extremo N terminal fusionada a Trx

Si bien el vector de expresión de AQP2 fusionada al marcador His (clon 8) se obtuvo en el punto (2) anterior, no expresó la proteína AQP2 en una cantidad suficiente. Por lo tanto, el fragmento NcoI-BamHI que carece de extremo N de la proteína AQP2 humana se extrajo del plásmido de expresión de AQP2 fusionada al marcador His No. 8 y se incorporó, utilizando una ligasa, al vector de expresión fusionado a Trx (pET32b) cuyo anillo se abrió en los sitios NcoI e HindIII. Se realizó la PCR de las colonias utilizando el par de cebadores F2/R, y se confirmó que el fragmento estaba insertado en las colonias de *E. coli* No. 2 y No. 8.

[0062]

Los plásmidos se extrajeron de las colonias de *E. coli* No. 2 y No. 8 y se examinó si el fragmento de ácidos nucleicos que tenía un tamaño prescripto (NcoI-HindIII: 686 bp) estaba presente, utilizando dos tipos de enzimas de restricción específicas para el gen de AQP2. Se confirmó que existía un fragmento de ácido nucleico de 686 bp en el No. 2 y el No. 8 y se insertó allí un gen de AQP2 que carecía de extremo N.

[0063]

(4) Expresión de la proteína de AQP2 deficiente de extremo N fusionada a Trx en *E. coli*

Dado que no se observaron errores en las secuencias de los vectores de expresión de AQP2 deficiente de extremo N fusionada a Trx No. 2 y No. 8, se precultivó *E. coli* de cada colonia, se lo agregó a 100 mL de medio LB y se lo indujo durante la noche a temperatura ambiente utilizando IPTG (isopropil-b-D-tiogalactopiranosido: inductor de b-galactosidasa que se utiliza en un agente inductor de expresión para un vector de expresión que tiene un promotor Lac o un promotor tac), a través de lo cual se produjo la proteína AQP2 deficiente de extremo N fusionada a Trx en células de *E. coli*.

[0064]

Se cultivaron dos tipos (No. 2 y No. 8) de *E. coli*. Se prepararon muestras pre-IPTG (antes de la inducción), muestras post-IPTG (después de la inducción) y fracciones insolubles y fracciones solubles que fueron obtenidas solubilizando el *E. coli* inducido, para la SDS-PAGE/tinción con CBB y análisis Western. Para la detección, se utilizó un anticuerpo de péptido de AQP2 humana sintético disponible comercialmente (suero de conejo anti-AQP2 humana, PherMingen). Tal como se puede observar en la FIG. 3, la expresión de la proteína AQP2 deficiente de extremo N fusionada a Trx no fue confirmada en las muestras de inducción pre-IPTG 2) y 7). Sin embargo, se confirmó una

gran cantidad de proteína AQP2 deficiente de extremo N fusionada a Trx en las muestras de inducción post-IPTG 3) y 8). Dado que la proteína de fusión existía más en las fracciones insolubles de *E. coli* 4) y 9) que en las fracciones solubles 5) y 10), se halló que la proteína de fusión existía como cuerpo de inclusión.

[0065]

Tal como se ha descrito anteriormente, el gen de AQP2 humana se clonó de ADNc humano mediante PCR, y se confirmó que el gen de AQP2 humana obtenido coincidía completamente con el de tipo silvestre. Además, al utilizar este gen de AQP2 humana, fue posible expresar la proteína AQP2 humana fusionada a Trx que carecía de aproximadamente 30 aminoácidos del extremo N de la proteína AQP2 humana.

[0066]

A continuación, se hará referencia a esta proteína como "proteína AQP2 humana fusionada a Trx/His expresada en *E. coli*" o "proteína AQP2 humana fusionada a Trx".

[0067]

Ejemplo de Producción de Referencia 2: Producción de AQP2 humana marcada con His expresada en célula de insecto Sf-9 (hAQP2/His/Sf-9). Ver FIG. 4 (1)

Se insertó ADNc con una secuencia marcada con His agregada en el extremo 5' de AQP2 en un sitio de multiclonación del plásmido dador pFastBac1 (pFastBac1-AQP2). Las células competentes de *E. coli* DH10Bac se

transformaron utilizando pFastBac1-AQP2. Con respecto a los clones que eran blancos sobre una placa de agar a la cual se había agregado Bluo-gal e IPTG, la confirmación de si un Bámido incluye la inserción de AQP2 (Bámido de AQP2 recombinante) se llevó a cabo mediante PCR. El Bámido de AQP2 recombinante se extrajo, purificó y transfectó en células Sf-9, utilizando CELLFECTIN (Invitrogen). Se recolectó el sobrenadante de cultivo después de 72 horas desde la transfección, para ser utilizado como Baculovirus Recombinante (rBaculovirus-AQP2). Hasta la obtención de un título suficiente del rBaculovirus-AQP2 en el sobrenadante del cultivo, se repitieron la infección, la amplificación, la recolección y la reinfección del rBaculovirus-AQP2 en células Sf-9. Las células Sf-9 se infectaron con el rBaculovirus-AQP2, se cultivaron de 2 a 4 días, y se recolectaron las células. Se efectuó la SDS-PAGE utilizando las células, y se confirmó la expresión del rBaculovirus-AQP2 mediante transferencia Western utilizando el anticuerpo de AQP2. La FIG. 4 (2) muestra los resultados.

[0068]

Ejemplo de Producción de Referencia 3: Anticuerpo policlonal de conejo para AQP2 humana

La proteína AQP2 humana fusionada a Trx producida en el Ejemplo de Producción de Referencia 1 se purificó y utilizó para inmunizar conejos (especies/cepas: Conejo/Blanco de Nueva Zelanda, sexo: hembra, peso: 3 a 3,5 kg, obtenidos de

KITAYAMA LABES), para producir un anticuerpo policlonal.

[0069]

(1) Preparación del inmunógeno

Se utilizó como inmunógeno la proteína AQP2 humana fusionada a Trx (hAQP2/Trx) purificada, utilizando un gel de agarosa Ni-NTA, del *E. coli* en el cual se confirmó la expresión de AQP2 humana en el Ejemplo de Producción de Referencia 1. Para la inmunización, se preparó el inmunógeno (hAQP2/Trx) en una cantidad igual a 200 µg/mL, utilizando PBS(-). Se mezclaron 2,5 mL del inmunógeno con igual volumen de adyuvante completo de Freund (DIFCO, Cat. No. 263810), utilizando dos jeringas de vidrio conectadas por una llave de tres vías, para preparar una emulsión.

[0070]

(2) Preparación del anticuerpo policlonal

(2-1) Inmunización

El inmunógeno (hAQP2/Trx) preparado anteriormente se inyectó por vía intradérmica en el lomo de conejos cada 2 semanas en múltiples puntos a razón de 1 mL/cuerpo para la inmunización. Después de 1 semana desde la tercera inmunización, se realizaron tomas de muestras parciales de sangre del lóbulo de la oreja, y se verificó el título del anticuerpo mediante el método ELISA que se describe en el punto (2-2) que aparece más adelante. Además, se realizaron inmunizaciones adicionales, después de 1 semana desde la séptima inmunización, se realizaron tomas de muestras

totales de sangre de la arteria carótida. La sangre recogida se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para recoger el suero. El título de anticuerpo del antisuero se verificó mediante el método ELISA descrito en el punto (2-2) que aparece a continuación, y se examinó la reactividad en una transferencia Western.

[0071]

(2-2) Medición del título del anticuerpo mediante ELISA

El inmunógeno (hAQP2/Trx) preparado en una cantidad igual a 1 µg/mL utilizando PBS(-) se colocó en una placa de 96 cavidades a razón de 100 µL/cavidad, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas o más. Por otro lado, con respecto a las células Sf-9 que expresan hAQP2/His (hAQP2/His/Sf-9) (Ejemplo de Producción de Referencia 2), las células Sf-9 que expresan hAQP2/His (hAQP2/His/Sf-9) que habían sido disueltas en 8M de Urea/50 mM Tris-HCl (pH 8,0), se colocaron en una placa de 96 cavidades a razón de 10 µL/cavidad, se agregaron 100 µL/cavidad de PBS(-), y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas o más.

[0072]

La solución de inmunógeno se retiró de la placa, se agregó 0,1% de BSA/PBS(-) a razón de 400 µL/cavidad en la placa, y se efectuó el bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora o más (placa recubierta con inmunógeno y placa recubierta con hAQP2/His/Sf-9).

[0073]

El antisuero obtenido a través de la toma de muestra parcial o total de sangre se diluyó con un factor de 1000 utilizando 0,1% BSA/PBS(-), y se sometió a ocho diluciones en serie a un índice común de 3 (series de dilución: de un factor de 1000 a un factor de 2.187.000). Como suero control, se diluyó Suero de Conejo Normal (NRS) y se lo preparó del mismo modo (series de dilución: de un factor de 1000 a un factor de 2.187.000).

[0074]

La solución de bloqueo se retiró de la placa de 96 cavidades y la serie de dilución del antisuero o el NRS se agregó a razón de 100 μ L/cavidad, y la mezcla se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente.

[0075]

Al día siguiente, la placa de 96 cavidades se lavó tres veces con una solución de lavado (0,05% Tween-20/0,9% NaCl), se agregó peroxidasa de rábano (HRP)-anti IgG de conejo en cabra (Biosource, Cat. No. ALI3404) diluida con un factor de dilución de 10000 utilizando 0,5% Tween-20/0,1 BSA/PBS(-), a razón de 100 μ L/cavidad, y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego, la placa se lavó cinco veces con una solución de lavado. Posteriormente, se agregó una solución colorante obtenida disolviendo tabletas de OPD (Sigma, Cat. No. P8287) en 1 mg/mL de una solución de dilución sustrato (monohidrato de ácido cítrico

7 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23,89 g/L, 0,015% H_2O_2), a razón de 100 μL /cavidad para permitir que la coloración proceda a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. Se agregaron 100 μL /cavidad de 2 N H_2SO_4 para detener la reacción, y se midió la absorbancia a 492 nm utilizando un iEMS Reader MF (Lab Systems).

[0076]

(2-3) Examinación de reactividad mediante transferencia Western

El inmunógeno (hAQP2/Trx) y un control Trx/His (obtenido sustituyendo una parte de AQP2 por una parte de extremo C 743-968 de proteína PKD2, es decir, PKD2 con un marcador Trx/His agregado) se diluyeron en 10 $\mu\text{g/mL}$ con 2-mercaptoetanol que contenía buffer de lisis para la electroforesis, y las mezclas se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. Las soluciones de antígeno y un marcador de peso molecular (Bio-Rad, Cat. No. 161-0373) se aplicaron a un gel de amida acrílica al 15% a razón de 10 μL /cavidad, y las muestras se analizaron mediante electroforesis a 25 mA/gel.

[0077]

Después de la electroforesis, un gel fue teñido con CBB G-250 (Bio-Rad Cat. No. 161-0786) y las proteínas en otro gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm (Bio-Rad, Cat. No. 162-0115) a 200 mA durante 1 hora, utilizando papel secante semiseco. Después de la transferencia, la membrana se sumergió en 5% de leche

descremada/50 mM Tris-HCl (pH 8,0) a temperatura ambiente durante 1 hora o más para el bloqueo. El antisuero y el NRS se diluyeron, cada uno de ellos, con un factor de 1000 utilizando 0,1% BSA/PBS(-) y se dejaron reaccionar con una membrana durante la noche a temperatura ambiente.

[0078]

Al día siguiente, la membrana se lavó con una solución de lavado, y se dejó reaccionar con HRP-anti IgG de conejo en cabra (Biosource, Cat. No. ALI3404) diluida con un factor de 3000 utilizando 0,5% Tween-20/0,1 BSA/PBS(-), a temperatura ambiente durante 2 horas. La membrana se lavó con una solución de lavado y se sumergió en una solución colorante para la coloración. La solución colorante se preparó disolviendo 4,84 g de tris (hidroximetil) aminometano, 5,84 g de cloruro de sodio, y 3,36 mL de ácido clorhídrico concentrado en H₂O para obtener un volumen total de 1 L. Para el uso, se agregaron 20 mL de 4-cloro-1-naftol/metanol al 0,3% y 60 µL de H₂O₂ al 30% en 100 mL de esta solución colorante, y se mezclaron.

[0079]

(2-4) Resultados de la preparación del anticuerpo policlonal

La FIG. 5 muestra los resultados del ensayo ELISA realizado en la serie de dilución (de un factor de 1000 a un factor de 2.187.000 veces) del suero recogido a través de la toma de muestra parcial de sangre realizada después de la tercera inmunización, utilizando una placa de 96 cavidades

en la cual se había formado una fase sólida de hAQP2/Trx o la hAQP2 expresada en células Sf-9 (hAQP2/Trx/Sf-9). En la FIG. 5, (A) muestra los títulos de anticuerpos para el inmunógeno (hAQP2/Trx) y (B) muestra los títulos de anticuerpos para la hAQP2 expresada en células Sf-9 (hAQP2/Trx/Sf-9). Como podemos observar en los resultados, se confirmó que el título de anticuerpos para el inmunógeno aumentó lo suficiente a través de tres inmunizaciones a un conejo.

[0080]

La FIG. 6 muestra los resultados de ensayos ELISA realizados de un modo similar después de la toma de muestra total de sangre realizada después de la séptima inmunización. En la FIG. 6, (A) muestra los títulos de anticuerpos para el inmunógeno (hAQP2/Trx) y (B) muestra los títulos de anticuerpos para la hAQP2 expresada en células Sf-9 (hAQP2/Trx/Sf-9). A los anticuerpos policlonales respectivos obtenidos en este momento se los denominó OPP21401, OPP21402, OPP21403, y OPP21404. Los volúmenes del antisuero fueron 50 mL, 52 mL, 50 mL, y 68 mL, respectivamente. Además, los títulos de anticuerpos finales fueron confirmados mediante ELISA, y se halló que OPP21403 mostró el mayor título de anticuerpo.

[0081]

Además, la reactividad de cada anticuerpo policlonal para cada tipo de antígeno (hAQP2/Trx, hAQP2/Trx/Sf-9, y

control Trx/His) fue examinada mediante transferencia Western. Específicamente, cada antígeno (hAQP2/Trx, hAQP2/Trx/Sf-9, y control Trx/His) transferido a una membrana de nitrocelulosa se dejó reaccionar con cada antisuero diluido con un factor de 1.000 para la coloración, utilizando un método de 4-cloro-1-naftol. La FIG. 7 muestra los resultados. Tal como se muestra en la FIG. 7, todos los anticuerpos (OPP21401, OPP21402, OPP21403, y OPP21404) reaccionaron no solo con hAQP2/Trx sino también con hAQP2/His/Sf-9. OPP21403 tuvo la reacción más fuerte con hAQP2/His/Sf-9.

[0082]

De esto, entre los cuatro tipos de anticuerpos policlonales obtenidos anteriormente, se consideró que OPP21403, que obtuvo la reacción mas fuerte con hAQP2, expresado en células Sf-9, resultó apropiado para la detección de AQP2 en una muestra derivada de un cuerpo vivo.

[0083]

[Tabla 1]

Nombre del anti-cuerpo	Inmunógeno	Animal inmuni-zado	Forma	Reactividad		
				hAQP2/Trx	hAQP2/His/Sf-9	Control Trx/His
OPP21401	AQP2 humana fusionada a Trx/His expresada en <i>E. coli</i>	Conejo	Suero	+	+	-
OPP2140	AQP2 humana	Conejo	Suero	+	+	-

Nombre del anti-cuerpo	Inmunógeno	Animal inmuni-zado	Forma	Reactividad		
				hAQP2/Trx	hAQP2/His/Sf-9	Control Trx/His
2	fusionada a Trx/His expresada en <i>E. coli</i>					
OPP2140 3	AQP2 humana fusionada a Trx/His expresada en <i>E. coli</i>	Conejo	Suero	+	+	-
OPP2140 4	AQP2 humana fusionada a Trx/His expresada en <i>E. coli</i>	Conejo	Suero	+	+	-

Ejemplo de Producción de Referencia 4: Anticuerpo monoclonal de ratón para AQP2 humana

La proteína AQP2 fusionada a Trx (hAQP2/Trx) producida en el Ejemplo de Producción de Referencia 1 se purificó e inyectó por vía intraabdominal para la inmunización en ratones (especies/cepas: Ratón/Balb/c, sexo: hembra y macho, obtenido de SLC), y se produjo un anticuerpo monoclonal a través de fusión celular con células de mieloma de ratón (nombre de la línea celular: P3U1, obtenida de ATCC).

[0084]

(1) Preparación del anticuerpo monoclonal

(1-1) Inmunización

Se inyectó 1 mL del inmunógeno (hAQP2/Trx) preparado en el Ejemplo de Producción de Referencia 3 (1) por vía intraabdominal para la inmunización de diez ratones

(especies/cepas: Ratón/Balb/c, sexo: hembra y macho, obtenido de SLC) tres veces cada 2 semanas. Tres días antes de la fusión de células, se inyectó hAQP2 a razón de 20 µg/cuerpo como última inmunización sin la utilización de un adyuvante.

[0085]

(1-2) Fusión de células

Las células de mieloma de ratón (nombre de la línea celular: P3U1, obtenida de ATCC) se descongelaron al menos 1 semana antes de la fusión de células y se cultivaron en 10% FCS/RPMI 1640. El día de la fusión de células, se confirmó bajo un microscopio que las células de mieloma de ratón eran suficientemente viables.

[0086]

Un único ratón (hembra) que había sido inmunizado en el punto (1-1) anterior fue anestesiado con éter, desinfectado utilizando etanol al 70%, y luego se le retiró el bazo de un modo estéril. Finalmente, se cortó el bazo con tijeras y se lo hizo pasar a través de una malla de acero en aproximadamente 10 mL de RPMI 1640 para ser colado. Esta suspensión se transfirió a un tubo de centrifugado de 15 mL y se centrifugó. Luego, se descartó el sobrenadante y se eliminaron los grumos del precipitado minuciosamente mediante golpecitos con el dedo. Se agregaron 4 mL de NH_4Cl al 0,747% al precipitado, y los glóbulos rojos innecesarios fueron hemolizados mezclando la mezcla levemente en una

pipeta. Luego, se agregaron de 6 a 7 mL de RPMI 1640 y la mezcla se centrifugó. Luego, se lavaron las células con RPMI 1640 nuevamente, y se resuspendieron en aproximadamente 10 mL de RPM 1640.

[0087]

Por otro lado, se transfirieron de 50 a 100 mL de la solución de cultivo P3U1 a un tubo de centrifugado de 50 mL y se sometieron a centrifugado para recolectar las células. Las células se lavaron una vez con RPMI 1640 y luego se resuspendieron en RPMI 1640. La suspensión de las células del bazo y la suspensión de P3U1 se combinaron para obtener un volumen de aproximadamente 30 mL, y la mezcla se centrifugó. Se descartó el sobrenadante y se eliminaron los grumos del precipitado minuciosamente mediante golpecitos con el dedo. Se agregaron 2 mL de Solución PEG al 50% (Sigma, Cat. No. P7181) al precipitado durante 30 segundos, a la vez que se agitaba el recipiente de la mezcla, y la mezcla luego se mezcló en la pipeta durante 30 segundos. Luego, se agregaron 5 mL de RPMI 1640 a la mezcla durante 2 minutos, se agregaron otros 5 mL de RPMI 1640, y la mezcla se dejó reposar a 37 °C durante 3 minutos y posteriormente se centrifugó la mezcla.

[0088]

Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en aproximadamente 100 mL de HAT (ICN, Cat. No. 1680849) al cual se había agregado 10% FCS/RPMI 1640, y

la cantidad total de las células se colocó en cuatro placas de cultivo de 24 cavidades para ser cultivadas a 37 °C en 5% de CO₂ (Incubador de CO₂; SANYO, MCO-17AIC). La condición de centrifugado fue temperatura ambiente, 1200 rpm, y 5 minutos, para todos los casos.

[0089]

(1-3) Detección de anticuerpos

Después de 1 semana a 10 días desde la fusión de células cuando fue posible confirmar visualmente las colonias formadas en la base de cada placa, se recogió una parte del sobrenadante de cultivo de cada cavidad para realizar la detección de anticuerpos. En la primera detección, se utilizó una solución no diluida del sobrenadante de cultivo, y en la segunda detección y de allí en adelante, el sobrenadante de cultivo se diluyó con un factor de 2,5 utilizando 0,1% BSA/PBS(-).

[0090]

La solución de bloqueo fue retirada de la placa recubierta con inmunógeno y la placa recubierta con hAQP2/His/Sf-9 producida de un modo similar al que se describe en el Ejemplo de Producción de Referencia 3 (2) (2-2), el sobrenadante de cultivo se agregó a cada placa a razón de 100 µL/cavidad, y la mezcla se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente.

[0091]

Al día siguiente, cada una de las placas se lavó tres

veces utilizando una solución de lavado, se agregó HRP-anti IgG de conejo en cabra (Biosource, Cat. No. 170-6516) diluido con un factor de 5000 utilizando 0,5% Tween-20/0,1% BSA/PBS(-), a la placa en una cantidad igual a 100 μ L/cavidad y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego, la placa se lavó cinco veces con una solución de lavado. Una solución colorante obtenida por disolución de tabletas de OPD, que había sido preparada de un modo similar al que se describe en el Ejemplo de Producción de Referencia 3 (2) (2-2), se agregó a la placa a razón de 100 μ L/cavidad, para permitir que la coloración proceda durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μ L/cavidad de 2 N H_2SO_4 para detener la reacción. Luego, se midió la absorbancia utilizando el iEMS Reader MF (Lab Systems).

[0092]

Para la clonación, se seleccionaron las cavidades que eran positivas tanto en la placa recubierta con inmunógeno como en la placa recubierta con hAQP2/His/Sf-9.

[0093]

(1-4) Clonación de hibridoma

La clonación de hibridoma se llevó a cabo a través de un método de dilución limitante.

[0094]

Los ratones inmunes (machos) anestesiados con éter fueron desinfectados utilizando etanol al 70%, y luego se

extrajerón sus bázos de un modo estéril. Se prepararon células nutrientes a través de operaciones similares a las del método de preparación de células de bazo descrito en el punto (1-2) anterior. Las células del bazo de un ratón individual se resuspendieron en aproximadamente 40 mL de 10% FCS/RPMI 1640 y se sembraron en cuatro placas de cultivo de 96 cavidades en una cantidad igual a 100 µL/cavidad. Las células de las cavidades positivas en el punto (1-3) anterior se diluyeron en serie de acuerdo con el número de células, y se sembraron en una cantidad equivalente a 100 µL/cavidad en una placa de cultivo de 96 cavidades en la cual se habían sembrado las células nutrientes, y las células se cultivaron a 37 °C en 5% de CO₂.

[0095]

La clonación y la detección de repitieron varias veces y se seleccionaron las cavidades que eran positivas en la detección y las cuales se confirmó, mediante observación microscópica, que contenían un único clon. Este clon se clonó nuevamente a través del método de dilución limitante. Luego, en la próxima detección, se confirmó que todas las cavidades en las que existían células eran positivas y las cavidades en las que no existían células eran negativas. Se seleccionó un único clon de esta placa y se estableció como hibridoma productor de anticuerpos monoclonales.

[0096]

El hibridoma establecido se cultivó en serie para su

expansión en 10% FBS/RPMI 1640 para obtener aproximadamente 50 mL de una solución de cultivo celular (solución de cultivo de hibridoma). Se transfirieron aproximadamente 40 mL de esta solución a un tubo de centrifugado de 50 mL, y se centrifugó a temperatura ambiente a 1200 rpm durante 5 minutos para recolectar las células (hibridoma). Las células se suspendieron en 3 mL de un tanque de células (JUJI FIELD, Cat. No. BLC-1), y la suspensión se dispensó en tres criotubos a razón de 1 mL y se conservó en nitrógeno líquido. Una parte del sobrenadante centrifugado se conservó a 4 °C y se sometió a tipificación de anticuerpos y transferencia Western.

[0097]

(1-5) Recolección de fluido ascítico

Para obtener un anticuerpo purificado para ser utilizado para establecer un sistema de ensayo ELISA, el hibridoma obtenido anteriormente se inyectó en ratones y se recogió la ascitis que contenía una gran cantidad de anticuerpos.

[0098]

Específicamente, aproximadamente 10 mL de la solución de cultivo celular (solución de cultivo de hibridoma) preparada en el punto (3-4) se centrifugaron a temperatura ambiente a 1200 rpm durante 5 minutos, para recoger las células (hibridoma). Las células lavadas una vez PBS(-) se resuspendieron en 1,5 mL de PBS(-) y se inyectaron

cantidades equivalentes a 0,5 mL de la suspensión en las cavidades peritoneales de tres ratones machos. Previamente se había inyectado 0,5 mL/cuerpo de pristina (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano; Sigma, Cat. No. T7640) por vía intraperitoneal en cada uno de los ratones al menos 3 días antes de la inyección de células.

[0099]

Se recogió la ascitis cuando los tamaños de los abdómenes de los ratones inyectados con las células se encontraban en su tamaño máximo. Se tomó la ascitis de un ratón individual de un modo estéril y se centrifugó a temperatura ambiente a 1200 rpm durante 5 minutos para recoger el sobrenadante. Luego, se hemolizaron los glóbulos rojos en el precipitado utilizando 0,747% NH_4Cl , como en la preparación de las células nutrientes. Las células se lavaron con RPMI 1640 y luego se suspendieron en 3 mL de un tanque de células. La suspensión se dispensó en tres criotubos a razón de 1 mL, para ser conservada en nitrógeno líquido. La ascitis de otros dos ratones se centrifugó a temperatura ambiente a 3000 rpm durante 10 minutos para recoger los sobrenadantes. Los sobrenadantes obtenidos de tres ratones se conservaron a 4 °C.

[0100]

(1-6) Tipificación de anticuerpos

Los anticuerpos obtenidos se clasificaron en subclases y tipos de cadena L, utilizando antisuero anti Ig de ratón

(IgG1, G2a, G2b, G3, M, cadena k y cadena l) (BIONETICS).

[0101]

Se retiró la solución de bloqueo de una placa recubierta con inmunógeno producida de un modo similar al Ejemplo de Producción de Referencia 3 (2) (2-2), se agregó el sobrenadante de cultivo obtenido en el punto (1-4) en una cantidad equivalente a 100 μ L/cavidad y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado. Cada uno de los antisueros anti Ig de ratón (IgG1, G2a, G2b, G3, M, cadena k, y cadena l) se diluyó con un factor de 1000 utilizando 0,1% BSA/PBS(-), y se agregaron 100 μ L de cada una de las diluciones a una cavidad. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado, se agregó HRP-anti IgG de conejo en cabra diluido con un factor de 10000 utilizando 0,05% de Tween-20/0,1% de BSA/PBS(-) a razón de 100 μ L/cavidad, y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego, la placa se lavó cinco veces con una solución de lavado, se agregó una solución colorante por disolución de tabletas de OPD, que había sido preparada de un modo similar al del Ejemplo de Producción de Referencia 3 (2) (2-2), en una cantidad igual a 100 μ L/cavidad, para permitir que la coloración proceda a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregó 100 μ L/cavidad de 2 N H_2SO_4 para detener la reacción, y se midió

la absorbancia a 492 nm utilizando el iEMS Reader MF (Lab Systems).

[0102]

Los que exhibieron las reacciones más raras fueron determinados como sus subclases y la cadena L del anticuerpo.

[0103]

(1-7) Examinación de la especificidad de anticuerpos mediante transferencia Western.

Se realizó la transferencia Western de un modo similar al del Ejemplo de Producción de Referencia 3 (2) (2-3) y las membranas bloqueadas se dejaron reaccionar durante la noche con el sobrenadante de cultivo obtenido en el punto (1-4) a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavó cada una de las membranas con una solución de lavado, y se dejó reaccionar con HRP-anti IgG de ratón en cabra diluido con un factor de 3000 utilizando 0,05% de Tween-20/0,1% de BSA/PBS(-) a temperatura ambiente durante 2 horas. La membrana se lavó con una solución de lavado y se dejó que la coloración proceda utilizando un método similar al que se describe en el Ejemplo de Producción de Referencia 3 (2) (2-2).

[0104]

(2) Resultado de la preparación de anticuerpos monoclonales

A través de las operaciones anteriores, se establecieron dos clones del hibridoma productor de

anticuerpos monoclonales, de diez ratones inmunes a la hAQP2/Trx. Estos hibridomas se denominaron OPH21401 y OPH21402, y los anticuerpos producidos de los hibridomas se denominaron OPM21401 y OPM21402, respectivamente. Para cada uno de OPM21401 y OPM21402, la subclase era IgG1 y la cadena L era la cadena k.

[0105]

Se examinaron las especificidades de estos anticuerpos mediante transferencia Western. Tal como se observa en la FIG. 8, ambos anticuerpos reaccionaron tanto con hAQP2/Trx como con hAQP2/His/Sf-9, y no reaccionaron con un control Trx/His. Por lo tanto, se considera que los dos tipos de anticuerpos monoclonales obtenidos anteriormente son anticuerpos específicos de la AQP2 humana.

[0106]

[Tabla 2]

Nombre del anti-cuerpo	Inmunógeno	Animal inmuni-zado	Forma	Reactividad		
				hAQP2/Trx	hAQP2/His/Sf-9	Control Trx/His
OPM21401	AQP2 humana fusionada a Trx/His expresada en <i>E. coli</i>	Ratón	Ascitis	+	+	-
OPM21402	AQP2 humana fusionada a Trx/His expresada en <i>E. coli</i>	Ratón	Ascitis	+	+	-

(3) Purificación de anticuerpos monoclonales

Se agregaron 4 mL de un Buffer de Unión (3,3 M NaCl/1,5 M glicina, NaOH 8,5 g/L) a 2 mL de la ascitis de ratón recolectada en el punto (1) (1-5) anterior, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas, y luego se centrifugó bajo una condición de 3000 rpm, 30 minutos y 4 °C para recolectar el sobrenadante. Este sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 µm, y se aplicó a una columna de Proteína-A Sepharosa que había sido equilibrada de antemano con el Buffer de Unión anterior. La columna se lavó con el Buffer de Unión, se eluyó con un Buffer de Elución (Bio-Rad, Cat. No. 153-6162), y se neutralizó inmediatamente con 2 M Tris. El eluato se dializó contra 0,1 M NaHCO₃, luego se midió su absorbancia a una longitud de onda de 280 nm para obtener la concentración de IgG utilizando la siguiente fórmula de cálculo.

[0107]

Concentración de IgG (mg/mL) = valor OD₂₈₀ de la solución de IgG x 0,714

[0108]

Ejemplo Experimental 1: Establecimiento del ensayo ELISA de acuaporina 2 (AQP2)

Para monitorear inmediatamente las condiciones patológicas de la enfermedad renal poliquística (PKD), se examinó si la acuaporina 2 (AQP2) se puede utilizar como una proteína candidata de los biomarcadores para la enfermedad,

si se puede establecer un sistema de ensayo (ELISA) que utilice un anticuerpo para la acuaporina 2 (AQP2), y si se pueden realmente monitorear las condiciones patológicas de la PKD utilizando el sistema de ensayo.

[0109]

Para el ensayo ELISA, se utilizaron un anticuerpo policlonal (nombre del anticuerpo: OPP21403) (ver Ejemplo de Producción de Referencia 3) y un anticuerpo monoclonal (nombre del anticuerpo: OPM21401) (ver Ejemplo de Producción de Referencia 4) que habían sido producidos, respectivamente, por: clonación del gen de AQP2 humana, adición de un marcador de Trx a su extremo N, producción de la "proteína AQP2 fusionada a Trx" (ver Ejemplo de Producción de Referencia 1) por expresión del gen marcado con Trx en *E. coli*, e inmunización de conejos y ratones con la proteína producida.

[0110]

Como proteína estándar para ELISA, se utilizó una "proteína hAQP2 fusionada a GST" expresada en *E. coli*. Como control, se utilizó la proteína AQP2 humana marcada con His "hAQP2-His/Sf-9" (ver Ejemplo de Producción de Referencia 2) expresada en células de insecto Sf-9.

[0111]

(1) Pruebas para establecer el ensayo ELISA

(1-1) Examinación de la condición de procesamiento de la muestra de prueba

Dado que la AQP2 es una proteína de membrana enterrada en una membrana, se examinaron las condiciones para la solubilización de la AQP2 de la membrana utilizando varios solubilizantes (Urea, Triton X-100, NP-40, Tween-20, clorhidrato de guanidina y SDS), que no afectan el sistema de ensayo.

[0112]

Específicamente, se mezcló un líquido (suspensión de hAQP2-His/Sf-9) obtenido por suspensión, en PBS, de "hAQP2-His/Sf-9", que es una proteína AQP2 humana enterrada en una membrana de una célula de insecto, con cada uno de los diferentes solubilizantes (Urea, Triton X-100, NP-40, Tween-20, clorhidrato de guanidina o SDS) en iguales volúmenes, la mezcla se diluyó con un factor de 10 utilizando 10% FBS/0,1% BSA/PBS, y se llevó a cabo el ensayo ELISA. Luego, se midió la coloración como la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm.

[0113]

La FIG. 9 muestra los resultados.

[0114]

Como podemos observar de los resultados, se confirmó que, en comparación con la utilización de urea o clorhidrato de guanidina, la AQP2 se puede solubilizar de una membrana de un modo más eficaz y con un mayor rendimiento cuando, como solubilizante, se utiliza un surfactante como por ejemplo Triton X-100, NP-40, o Tween-20 (que son

surfactantes no iónicos) o dodecilsulfato de sodio (SDS, que es un surfactante aniónico).

[0115]

(1-2) Examinación del estabilizante en un sistema de ensayo ELISA

Para poder medir establemente la proteína solubilizada en cuestión (AQP2) mediante ELISA, la examinación se llevó a cabo con respecto a un primer buffer que se utilizará para la reacción utilizando un anticuerpo primario.

[0116]

Específicamente, se examinó si un estabilizante agregado al primer buffer (0,2% BSA / 10 mM EDTA / 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)) afecta la coloración en el sistema de ensayo ELISA, de la siguiente manera: se agregó cada estabilizante (Urea, Triton X-100, NP-40, Tween-20, clorhidrato de guanidina y SDS) al primer buffer en varias concentraciones (proporción de dilución con respecto a una concentración del 1%: 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/6, 1/32, 1/64 y 1/128); y se midió la absorbancia de la proteína en cuestión (AQP2) a una longitud de onda de 492 nm.

La proteína en cuestión se preparó mediante: solubilización completa de una suspensión de la hAQP2/Sf-9, que es una proteína AQP2 humana enterrada en una membrana de una célula de insecto, con el solubilizante SDS anteriormente descrito; y dilución de esta mezcla con un factor de 2000 utilizando 0,1% BSA/PBS para eliminar la

influencia de SDS.

[0118]

La FIG. 10 muestra los resultados. Tal como se indica en la FIG. 10, cuando se utilizaron como estabilizante agregado al primer buffer, los surfactantes no iónicos tales como Triton X-100, NP-40, y Tween-20 aumentaron la sensibilidad de la medición en concentraciones iguales o superiores al 0,063% (proporción de dilución: 1/16), mientras que la urea, el clorhidrato de guanidina y el SDS deterioraron la coloración. Por lo tanto, se determinó que Triton X-100 al 1% es favorable como estabilizante para ser agregado al primer buffer; en otras palabras, se determinó que 0,2% BSA / 10 mM EDTA / 2% Triton X-100 / 0,2M Tris-HCl (pH 8,0) es favorable como primer buffer para ser utilizado en el ensayo ELISA.

[0119]

(1-3) Sistema de ensayo de AQP2 humana mediante ELISA
Sándwich

En los puntos (1-4) a (1-6) que se describen más adelante, se utilizó el siguiente sistema de ensayo ELISA en la examinación de proteínas estándares mediante ELISA, examinación de muestra de prueba, y examinación por comparación con transferencia Western.

[0120]

<Sistema de ensayo ELISA de AQP2 humana>

Se agregaron 100 μ L de un anticuerpo monoclonal (primer

anticuerpo: OPM21403) preparado a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ con 0,1 M NaHCO_3 a cada cavidad de una microplaca de 96 cavidades (NUNC), y la placa se tapó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Se removió la primera solución de anticuerpos de la placa y se agregó una solución de bloqueo (0,1% BSA/PBS(-)) a razón de 400 μL /cavidad, y se llevó a cabo el bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora o más. Luego, se retiró la solución de bloqueo de la placa en la cual se formó el primer anticuerpo como fase sólida, se agregaron 100 μL del primer buffer (0,2% BSA/2% Triton (marca registrada) X-100 / 10 mM EDTA / 200 mM Tris-HCl (pH 8,0)) a cada cavidad, luego se agregaron 50 μL de una proteína estándar o una muestra de prueba preparada en las concentraciones respectivas utilizando 0,1% BSA/PBS(-) y la placa se selló y se agitó durante la noche a temperatura ambiente.

[0121]

Al día siguiente, después de lavar la placa tres veces con una solución de lavado (0,05% Tween-20/0,9% NaCl), se agregaron 100 μL de un anticuerpo policlonal (segundo anticuerpo: OPP21403) diluido con un factor de 5000 utilizando suero porcino al 10%/0,05% Tween-20/0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), a cada cavidad, y se tapó la placa y se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 horas de reacción, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado, luego se agregaron 100 μL de peroxidasa de rábano (HRP)-anti IgG

de conejo en cabra (Biosource, Cat. No. ALI3404), que se había diluido con un factor de 10000 utilizando 0,05% Tween-20/0,1% BSA/PBS(-), a cada cavidad de la placa, y se tapó la placa y se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 horas, se lavó la placa cinco veces con una solución de lavado, luego se agregaron 100 μ L de solución colorante TMB (ScyTek, Cat. No. TM4999) a cada cavidad para permitir que se produzca la coloración a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se agregaron 100 μ L de Buffer de Detención TMB (ScyTek, Cat. No. TSB999) a cada cavidad de la placa para detener la reacción. Se limpiaron las manchas y el agua de la base de la placa con una toalla de papel suave, y luego se midieron las absorbancias de las cavidades respectivas a una longitud de onda de 450 nm utilizando un absorciómetro de microplaca (iEMS Reader MF, LABSYSTEMS).

[0122]

Se generó una curva estándar en base a los valores de absorbancia de la proteína estándar, y se determinó la concentración de AQP2 contenida en la muestra de prueba en base a la curva estándar.

[0123]

(1-4) Examinación de la proteína estándar

Con respecto a la proteína estándar, y utilizando el sistema de ensayo ELISA que se describe en el punto (1-3), se evaluó cuál de la AQP2 derivada de *E. coli* o la AQP2 derivada de la célula de insecto es apropiada como proteína

estándar para los ensayos ELISA.

Como AQP2 derivada de *E. coli*, se utilizó la "proteína AQP2 fusionada a Trx" producida a través del método que se describe en el Ejemplo de Producción de Referencia 1. Como AQP2 derivada de célula de insecto, se utilizó la "AQP2-His/Sf-9" producida a través del método que se describe en el Ejemplo de Producción de Referencia 2 y solubilizada con el solubilizante.

[0124]

La FIG. 11 muestra las curvas estándares generadas al realizar los ensayos ELISA descritos en el punto (1-3) anterior, utilizando las proteínas anteriores como proteína estándar. Tal como se muestra en la FIG. 11, en ambos casos donde se utilizó la "proteína AQP2 fusionada a Trx" como proteína estándar y donde la "AQP2/Sf9" solubilizada se utilizó como proteína estándar, se observó una correlación dependiente de la concentración (dosis) con la absorbancia medida, y ambas curvas se extienden en forma paralela entre sí. Por lo tanto, se halló que se puede utilizar cualquiera de las proteínas como proteína estándar para el ensayo ELISA de AQP2 humana.

[0125]

(1-5) Examinación de las muestras de prueba

Como muestras de prueba, se utilizaron cuatro muestras de orina (Nos. 4, 5, 6, y 9) que habían sido recolectadas de voluntarios humanos sanos y habían sido diluidas en serie

para realizar los ensayos ELISA que se describen en el punto (1-3) anterior. La FIG. 12 muestra los resultados, graficados con una curva estándar generada utilizando la "proteína AQP2 fusionada a Trx" como proteína estándar. [0126]

Tal como se muestra en la FIG. 12, en las cuatro muestras de orina utilizadas como muestras de prueba, se observó una correlación similar a la de la curva estándar entre la proporción de dilución y la absorbancia medida. Por lo tanto, se confirmó que, al utilizar la orina como muestra de prueba, el sistema de ensayo ELISA anterior permite la detección y cuantificación de la AQP2 contenida en la orina. Además, se realizaron mediciones de AQP2 humana en la orina de diez voluntarios humanos sanos de un modo similar. Las concentraciones de la AQP2 humana en la orina fueron de 0,93 a 8,84 ng/mL. Además, se confirmó que el límite de detección en el sistema de ensayo ELISA anterior fue 0,01 ng/mL. [0127]

(A) de la FIG. 13 muestra los resultados de las mediciones realizadas en la orina de diez voluntarios humanos sanos para cuantificar la AQP2 humana en la orina mediante transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal (OPM21401) (Ejemplo de Producción de Referencia 3) para la AQP2 humana. (B) de la FIG. 13 muestra las cantidades de AQP2 humana en la orina medida a través del sistema de ensayo ELISA anterior para los mismos diez

voluntarios humanos sanos. De estos resultados, se confirmó que las cantidades de AQP2 humana en la orina medida mediante el sistema de ensayo ELISA de la presente invención se correlaciona sustancialmente con los resultados de la transferencia Western. Cabe destacar que, de los resultados de la transferencia Western, se halló que la AQP2 derivada de humanos incluye la AQP2 con una cadena de carbohidratos agregada, y una AQP2 sin una cadena de carbohidratos.

[0128]

(2) Protocolo del ensayo ELISA de AQP2

En base a las examinaciones anteriores, se estableció un método ELISA de AQP2 que tiene el siguiente protocolo:

1. Se diluye un anticuerpo anti-AQP2 (anticuerpo monoclonal: OPM21401) para obtener 5 $\mu\text{g/mL}$ utilizando 0,1M NaHCO_3 , se dispensan 100 μL de la dilución en cada cavidad, y se deja la mezcla reposar a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.
2. Se retira la solución de anticuerpo anti-AQP2 de cada cavidad, se agregan 350 μL de una solución de bloqueo (0,1% BSA/PBS(-)) para cada cavidad, y se mantiene la placa a 4 °C hasta su uso.
3. Se retira la solución de bloqueo de la placa en la cual se ha formado una fase sólida del anticuerpo, y se agregan 100 μL de un primer buffer (0,2% BSA / 10 mM EDTA / 2% Triton X-100 / 0,2M Tris-HCl (pH 8,0)) a cada cavidad.

4. En cavidades prescriptas, se agregan 50 μ L de una AQP2 humana estándar de referencia en cada uno de los ocho niveles de concentración (0, 0,01, 0,04, 0,12, 0,37, 1,1, 3,3, y 10 ng/ml) y 50 μ L de una muestra de prueba (preferentemente, orina) que se desea medir, y se agita la placa a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.
5. Se lava la placa, se agregan 100 μ l de una solución de anticuerpos anti-AQP2 (anticuerpo policlonal: OPP21403) (diluida con un factor de 5000) a cada cavidad, y se agita la placa a temperatura ambiente durante 2 horas.
6. Se lava la placa, se agregan 100 μ l de una solución obtenida por dilución de anti IgG de conejo marcada con HRP con un factor de 10000 a cada cavidad y se deja que la reacción proceda a temperatura ambiente durante 2 horas.
7. Se lava la placa, se agregan 100 μ L de una solución de TMB a cada cavidad, se deja que la reacción proceda durante 10 minutos, y luego se agrega ácido sulfúrico 2N a cada cavidad para detener la reacción.
8. Se obtiene un valor OD450 utilizando un espectrómetro de absorción, y se determina la concentración de la AQP2 en la muestra de prueba en base a una curva de calibración estándar (ver FIG. 14) que había sido generada en la AQP2 humana estándar de referencia.

[0129]

Ejemplo Experimental 2: Examinación (No. 1) de condiciones de pretratamiento para la muestra de prueba

Para examinar las condiciones de pretratamiento para la muestra de prueba que se someterá a un inmunoensayo (ELISA) de la proteína AQP2 humana establecido en el Ejemplo Experimental 1, se realizaron los siguientes experimentos, utilizando orina como muestra de prueba. Como orina, se utilizó orina fresca recolectada de un voluntario humano sano.

[0130]

(1) Primera prueba y sus resultados

Se colocaron 5 ml de orina fresca en cinco tubos de 10 mL, y los tubos se conservaron durante 24 horas, bajo condiciones de 37 °C, 23 °C, 4 °C, -30 °C, y -80 °C (en la oscuridad). Después de la conservación, se dejó reposar cada muestra a temperatura ambiente para permitir que la muestra regrese a temperatura ambiente.

[0131]

Al utilizar la muestra como muestra de prueba, se llevó a cabo el ELISA de AQP2 establecido en el Ejemplo Experimental 1 para medir la cantidad de AQP2 humana en la orina. Como control, se realizó el ELISA de AQP2 anterior en una parte de la orina fresca, inmediatamente después de su recolección sin conservarla, para medir la cantidad de AQP2 humana en la orina.

[0132]

La cantidad de AQP2 humana obtenida de la muestra control se definió como 100, y se determinó una relación relativa de la cantidad de AQP2 humana obtenida para cada muestra conservada.

[0133]

Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 15, las cantidades de AQP2 humana en la orina conservada bajo las condiciones de 37 °C, 23 °C, 4 °C, y -80 °C (en la oscuridad) se redujeron significativamente en comparación con la cantidad de AQP2 humana en la muestra control, mientras que la cantidad de AQP2 humana en la orina conservada a -30 °C fue la misma cantidad que la AQP2 humana de la muestra control y no se observó ninguna reducción en la cantidad.

[0134]

(2) Segunda prueba y sus resultados

Cada una de las muestras de orina, que habían sido conservadas bajo condiciones de 37 °C, 23 °C, 4 °C, -30 °C, y -80 °C (en la oscuridad) y luego regresado a temperatura ambiente en la primera prueba, se dividieron en tres tubos; y cada uno de estos tubos se conservó bajo condiciones de 4 °C, -30 °C y -80 °C (en la oscuridad) durante 24 horas. Después de la conservación, cada una de las muestras se dejó en reposo a temperatura ambiente para regresar a temperatura ambiente.

[0135]

Utilizando las muestras como muestra de prueba, se midió la cantidad de AQP2 humana en la orina de un modo similar al que se ha descrito anteriormente. La cantidad de AQP2 humana obtenida de la muestra de prueba conservada a -30 °C en la primera prueba se definió como 100, y se determinó una relación relativa de la cantidad de AQP2 humana obtenida para cada muestra conservada.

[0136]

Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 15, con respecto a la muestra conservada a -30 °C en la primera prueba, la cantidad de AQP2 humana era constante y sustancialmente sin cambios, mientras que la muestra fue conservada, en la segunda prueba, a -30 °C a una condición de temperatura (4 °C o -80 °C) distinta de -30 °C. Además, aun en el caso de la muestra de prueba que fue conservada a una condición de temperatura (37 °C, 23 °C, 4 °C, o -80 °C) distinta de -30 °C en la primera prueba, si la muestra de prueba fue conservada a -30 °C en la segunda prueba, la cantidad de AQP2 humana en la orina era sustancialmente 100. Por lo tanto, se halló que es importante que la medición de AQP2 tenga la muestra de prueba conservada una vez a -30 °C.

[0137]

(3) Tercera prueba, cuarta prueba y quinta prueba y sus resultados

Cada muestra de orina conservada a una condición de 4 °C (en la oscuridad) y que regresó a temperatura ambiente en

la segunda prueba, se dividió en tres tubos, y estos tubos se conservaron nuevamente bajo una condición de 4 °C (en la oscuridad) durante 24 horas. Después de la conservación, cada muestra se dejó reposar bajo una condición de temperatura ambiente para regresar a temperatura ambiente. Luego, se tomó una parte de cada muestra (tercera prueba). La cuarta prueba y la quinta prueba se llevaron a cabo de un modo similar.

[0138]

Utilizando cada muestra de prueba después de estas pruebas (tercera prueba, cuarta prueba y quinta prueba) como muestra de prueba, se midió la cantidad de AQP2 en la orina de un modo similar al que se ha descrito anteriormente. La cantidad de AQP2 obtenida de la muestra de prueba conservada a -30 °C en la primera prueba se definió como 100, y se determinó una relación relativa de la cantidad de AQP2 humana obtenida para cada muestra de prueba.

[0139]

Como resultado, tal y como se muestra en la FIG. 15, cuando la condición de conservación era 37 °C, 23 °C, 4 °C, o -80 °C, la relación relativa del valor de AQP2 era 5 o inferior, y por lo tanto, no se pudo detectar la AQP2. Sin embargo, sólo si se aplicaba la condición de -30 °C al menos una vez, la AQP2 podía ser detectada con éxito. En el caso de la muestra de prueba conservada a -30 °C en la primera prueba, sin importar si fue conservada a -30 °C o a una

condición de temperatura (4 °C o -80 °C) distinta de -30 °C durante el período desde la segunda prueba hasta la quinta prueba, la cantidad de AQP2 humana en la orina casi no disminuyó y era estable. Además, se confirmó que, incluso en el caso de la muestra de prueba conservada bajo una condición de temperatura (37 °C, 23 °C, 4 °C, o -80 °C) distinta de -30 °C en la primera prueba o segunda prueba, si era conservada a -30 °C después de la segunda prueba o la tercera prueba, se suprimía significativamente la disminución de la cantidad de AQP2 humana en la orina.

[0140]

Estos resultados muestran que, cuando una muestra de prueba, orina en particular, es sometida a un inmunoensayo (ELISA) de la proteína AQP2 humana, es posible medir la AQP2 humana en forma precisa en un alto rendimiento, mediante congelamiento, al menos una vez, de la muestra de prueba bajo una condición de temperatura superior a -80 °C, específicamente, de -70 °C a 0 °C, en particular, -30 °C o una temperatura cercana a -30 °C (-35 °C a -15 °C).

[0141]

Ejemplo Experimental 3: Examinación (No. 2) de las condiciones de pretratamiento para la muestra de prueba

Para examinar las condiciones de pretratamiento para la muestra de prueba que se someterá a un inmunoensayo (ELISA) de la proteína AQP2 humana establecido en el Ejemplo Experimental 1, se realizaron los siguientes experimentos,

utilizando orina como muestra de prueba. Como orina, se utilizó orina fresca recolectada de un voluntario humano sano.

[0142]

Se colocaron 0,5 mL de orina fresca en siete tubos Eppendorf y se congelaron a una temperatura de -20 ± 5 °C (en la oscuridad) durante 1 día, 3 días, 7 días, 15 días, 21 días, 28 días, y 56 días. Después de la conservación, cada muestra se dejó reposar a temperatura ambiente para permitir que la muestra regrese a temperatura ambiente. Utilizando cada muestra como muestra de prueba, se llevó a cabo el ensayo ELISA de AQP2 establecido en el Ejemplo Experimental 1 para medir la cantidad de AQP2 humana en la orina.

[0143]

La FIG. 16 muestra los resultados. Tal como se muestra en la FIG. 16, se midió exitosamente, mediante ELISA, la cantidad de AQP2 humana en todas las muestras de orina congeladas a una temperatura de -20 ± 5 °C durante 3 días, 7 días, 15 días, 21 días, 28 días y 56 días. Se confirmó que cuando la orina (muestra biológica) es mantenida en estado congelado durante cierto período o más, como ser durante aproximadamente 2 semanas, los valores medidos se estabilizan. Estos resultados indican que en el inmunoensayo (ELISA) de la proteína AQP2 humana en una muestra de prueba, en particular en orina, la proteína AQP2 humana en la muestra biológica se puede medir cuantitativamente con alta

precisión manteniendo la muestra biológica en estado congelado durante aproximadamente 2 semanas o más.

[0144]

En base a los resultados anteriores, el período de congelamiento se estableció en 2 semanas, y se investigó el efecto de las temperaturas de congelamiento (-80°C , -30°C , -28°C , -26°C , -20°C , 4°C).

Más específicamente, utilizando muestras de orina fresca (Nos. 1 y 2) obtenidas de dos voluntarios humanos sanos, se dispensó 0,5 mL de cada muestra en seis tubos Eppendorf y se conservaron a -80°C , -30°C , -28°C , -26°C , -20°C , y 4°C (en la oscuridad) durante 2 semanas. Después de la conservación, cada muestra se dejó reposar a temperatura ambiente para permitir que la muestra regrese a temperatura ambiente. Utilizando cada muestra como muestra de prueba, se llevó a cabo el ensayo ELISA de AQP2 establecido en el Ejemplo Experimental 1 para medir la cantidad de AQP2 humana en la orina.

[0145]

La FIG. 17 muestra los resultados. Tal y como se muestra en la FIG. 17, las cantidad de AQP2 en la orina conservada a -80°C y 4°C (en la oscuridad) se encontraba por debajo del límite de detección, mientras que las cantidades de AQP2 en las muestras de orina conservadas a -30°C , -28°C , -26°C , y -20°C (en la oscuridad) durante 2 semanas fueron exitosamente medidas mediante ELISA.

[0146]

Los resultados anteriores confirman que cuando la orina utilizada en el inmunoensayo (ELISA) de la proteína AQP2 humana es congelada bajo una condición de temperatura de congelamiento de aproximadamente -30 °C a aproximadamente -20 °C durante un período de aproximadamente 2 semanas o más, se puede medir con precisión la proteína AQP2 humana en la orina con un alto rendimiento.

[Texto Libre del Listado de Secuencias]

[0147]

Las SEQ ID NOS. 2 y 3 son las secuencias base del cebador directo (hAQP2N-F) y del cebador inverso (hAQP2N-R) utilizados para amplificar la parte de extremo N del gel de AQP2 humana (hAQP2/primer mitad, hAQP2N) mediante PCR. Las SEQ ID NOS. 4 y 5 son las secuencias base del cebador directo (hAQP2C-F) y del cebador inverso (hAQP2C-R) utilizados para amplificar la parte de extremo C del gel de AQP2 humana (hAQP2/segunda mitad, hAQP2C) mediante PCR.

Revisión efectuada por Melissa Agudelo
COLO-20893-841-001-5
WPC20893\ID-260472

MMS\MMS\ID-270896\WPC20893

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0093536

Bogotá D.C., Septiembre 02 de 2014 - 17:09:29

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	636818206	02/09/2014	11.707.800.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA		128.000.00	128.000.00
				\$128.000.00

SON: **CIENTO VEINTIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-049592- -00002-0000

Fecha: 2014-09-03 16:51:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 75

CGL01. 20893-84-002-J

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Septiembre 2 de 2014 - 17:09:38