

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-049592-00000-0000

Fecha: 2014-03-07 17:07:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO METODO PARA EL PRETRATAMIENTO DE UNA MUESTRA BIOLOGICA
QUE CONTIENE PROTEINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. y NATIONAL UNIVERSITY
CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

DOMICILIO TOKYO, JAPON, RESPECTIVAMENTE

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

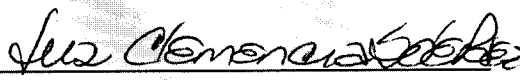
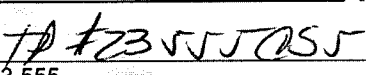
22. BOGOTÁ, D.C., _____

	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO de radicación  No. 14-049592- -00000-0000 Fecha: 2014-03-07 17:07:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 95
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/JP2012/070570	Fecha 2012/08/10
Publicación Internacional No.		WO/2013/022107 A1	Fecha 2013/02/14
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
MÉTODO PARA EL PRETRATAMIENTO DE UNA MUESTRA BIOLÓGICA QUE CONTIENE PROTEÍNA			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
G01N 001/028, G01N 033/048, G01N 033/053, G01N 033/543			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1. OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome- Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japón	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Tokyo	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Japón	Japón
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. SASAKI		Sei	Japonés
2. OHMOTO		Yasukazu	Japonés
3. MORI		Toyoki	Japonés
4. IWATA		Fusako	Japonés
5. MURAGUCHI		Masahiro	Japonés
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Japón		Tokyo	c/o National University Corporation Tokyo Medical and Dental University, 5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138510, Japón
2. Japón		Osaka	c/o Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón
3. Japón		Osaka	c/o Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón
4. Japón		Osaka	c/o Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón
5. Japón		Osaka	c/o Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN JAPON		CÓDIGO PAÍS JP	(31) NÚMERO 2011/176272 (32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2011/08/11
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. <u>14-0019339</u> No. <u>14-0021777</u>	Fecha: <u>2014/02/19</u> Fecha: <u>2014/02/25</u>

16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>	
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma 
C.C 35.456.344 de Usaquén		Tarjeta Profesional 23.555 

\\MMS\SDC\ID-AF261411\WPC20893

LA

17 ANEXOS	
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>56</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>13</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>12</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes de OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. y NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY 10. ☒ Dos (2) documentos que legalmente prueban la cesión de los cinco (5) inventores a los solicitantes. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☒ Hoja de información complementaria (uno (1) solicitante) ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$515.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 3 reivindicaciones adicionales a 10 por \$93.000.



HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención			FECHA DE PRESENTACIÓN	
☐ Patente de Modelo de Utilidad				
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2. NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2. Japón			Tokyo	5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138510, Japón
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 2 月 14 日(14.02.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/022107 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/070570
- (22) 国際出願日: 2012 年 8 月 10 日(10.08.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-176272 2011 年 8 月 11 日(11.08.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社(OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018535 東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地 Tokyo (JP). 国立大学法人東京医科歯科大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐々木 成 (SASAKI, Sei) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 大本 安一 (OHMOTO, Yasukazu) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 大塚製薬株式会社内 Osaka (JP). 森 豊樹 (MORI, Toyoki) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 大塚製薬株式会社内 Osaka (JP). 岩田 房子 (IWATA, Fusako) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 大塚製薬株式会社内 Osaka (JP). 村口 正宏 (MURAGUCHI, Masahiro) [JP/JP]; 〒5410045 大

- 阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 大塚製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (Sae-gusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRETREATING BIOLOGICAL SAMPLE CONTAINING PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質を含む生体試料の前処理方法

(57) Abstract: Provided is a method for pretreating a biological sample in cases where a protein contained in the biological sample is determined using an immunological method. A method for pretreating a biological sample in cases where a protein contained in the biological sample is determined using an immunological method, said method for pretreating a biological sample being characterized by comprising the following steps: (1) the biological sample is frozen at a temperature higher than -80°C, in particular, at a temperature of not less than -70°C; (2) the frozen biological sample is thawed; and (3) the biological sample is solubilized using a surfactant.

(57) 要約: 生体試料に含まれるタンパク質を免疫学的方法を用いて測定する場合の、生体試料の前処理方法を提供する。生体試料に含まれるタンパク質を、免疫学的方法を用いて測定する場合の生体試料の前処理方法であって、下記工程を有することを特徴とする方法: (1) 生体試料を、-80°Cより高い温度条件、特に-70°C以上の温度条件で凍結処理する、(2) 凍結した生体試料を解凍する、及び (3) 生体試料を界面活性剤を用いて可溶化する。

WO 2013/022107 A1

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).

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.

[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 lumbinales 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. 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

27

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/primer 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 μ L/cavidad, se agregaron 100 μ L/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 μ L/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 se había expresado en células Sf-9 y que había tenido la reacción más fuerte con hAQP2, 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
OPP2140 1	AQP2 humana fusionada a Trx/His expresada en <i>E. coli</i>	Conejo	Suero	+	+	-
OPP2140 2	AQP2 humana fusionada a Trx/His expresada en <i>E. coli</i>	Conejo	Suero	+	+	-
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 NH₄Cl 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 μ L/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 extrajeron sus bazo 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 μ L/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 μ L/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 μL /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 μL 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 μ 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 μ L/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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 µg/mL utilizando 0,1M NaHCO₃, 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 µL 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 µL 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 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ (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.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el pretratamiento de una muestra biológica en el inmunoensayo de una proteína contenida en la muestra biológica, el método comprende las etapas de:
 - (1) congelar la muestra biológica a una temperatura superior a -80°C ;
 - (2) descongelar la muestra biológica congelada; y
 - (3) solubilizar la muestra biológica utilizando un surfactante.
2. Un método para el pretratamiento de una muestra biológica en el inmunoensayo de una proteína contenida en la muestra biológica, el método comprende las etapas de:
 - (2') descongelar una muestra biológica congelada a una temperatura superior a -80°C ; y
 - (3) solubilizar la muestra biológica utilizando un surfactante.
3. El método de pretratamiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la muestra biológica es un fluido corporal de un animal que incluye un ser humano.
4. El método de pretratamiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el fluido corporal es orina.
5. El método de pretratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el surfactante utilizado en una etapa de solubilización (3) es un surfactante no iónico.

6. El método de pretratamiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el surfactante no iónico es polioxietileno(10) octilfenil éter.
7. El método de pretratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el inmunoensayo es ELISA.
8. El método de pretratamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la proteína es una proteína de membrana.
9. Un inmunoensayo para determinar una proteína contenida en una muestra biológica, caracterizado porque la muestra biológica es pretratada con el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. El inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 9, que es ELISA.
11. El inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque la muestra biológica es orina.
12. El inmunoensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque la proteína es una proteína de membrana.
13. El inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque la proteína es acuaporina.

RESUMEN

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

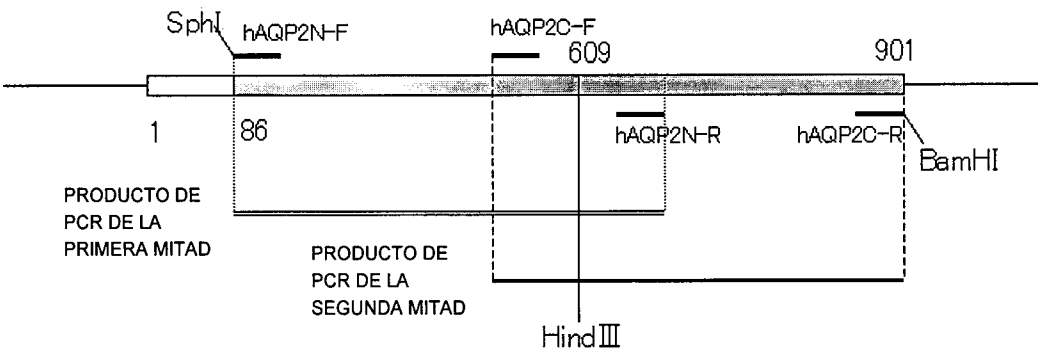
[Fig. 1]

CEBADOR hAQP2 / PRIMERA MITAD

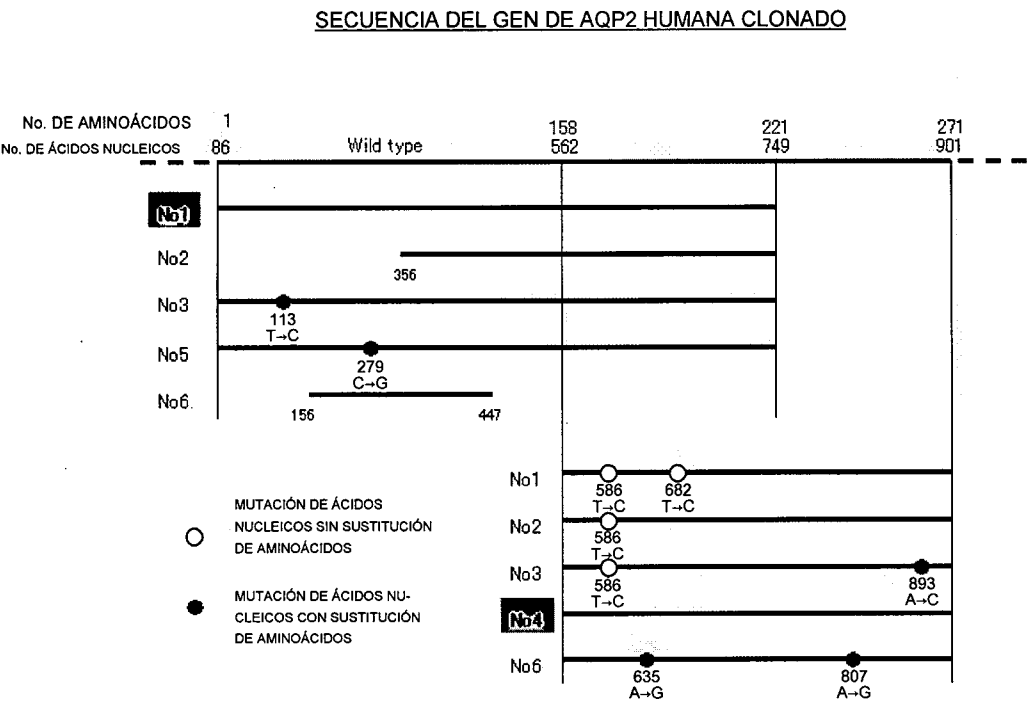
hAQP2N-F; 5'-GG **GCA TGC** ATG TGG GAG CTC CGC TCC ATA G-3'
SphI 86 107
hAQP2N-R; 5'-CGT AGT TGT AGA GGA GGG AGC C-3'
749 728

CEBADOR hAQP2 /SEGUNDA MITAD

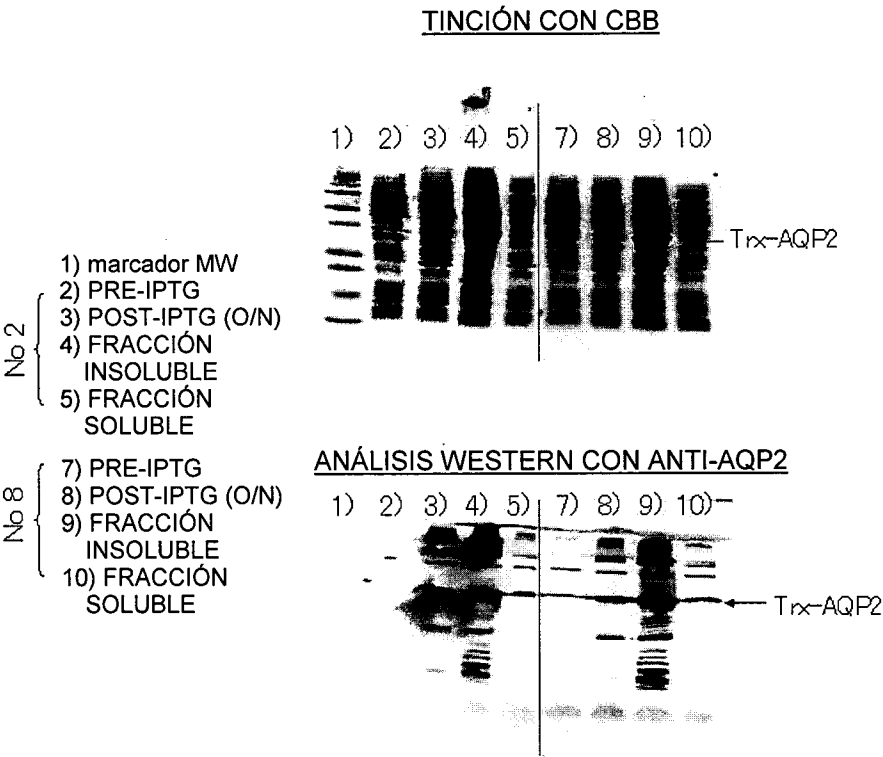
hAQP2C-F; 5'-CCC TGC TCT CTC CAT AGG CTT C-3'
562 583
hAQP2C-R; 5'-CC **AAG CTT** TCA GGC CTT GGT ACC CCG TGG-3'
BamHI 901 881



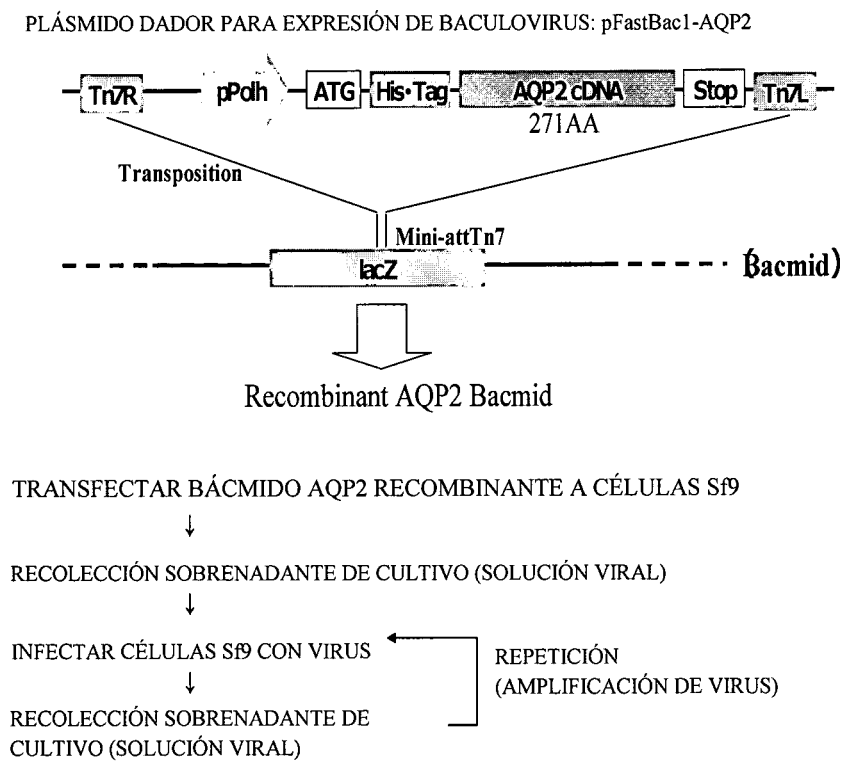
[Fig. 2]



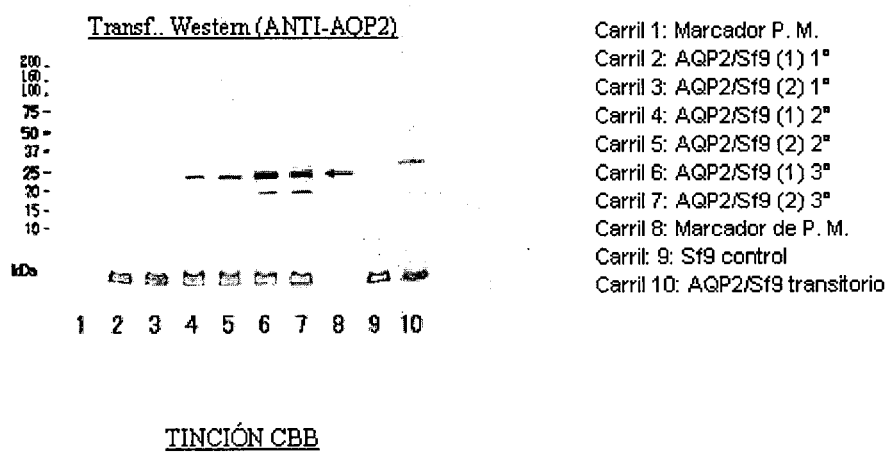
[Fig. 3]



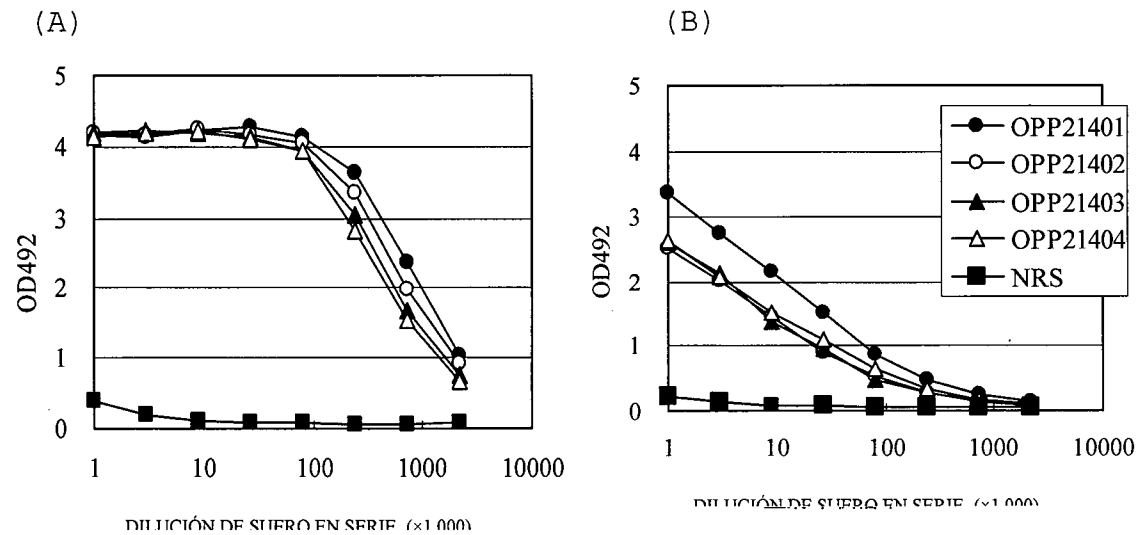
[Fig. 4]
(1)



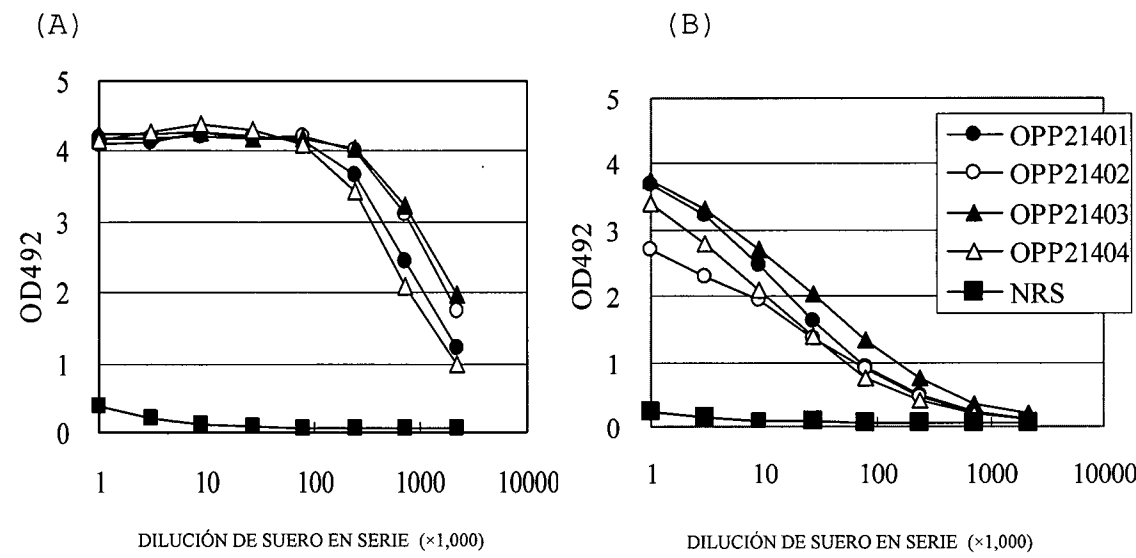
[Fig. 4]
(2)



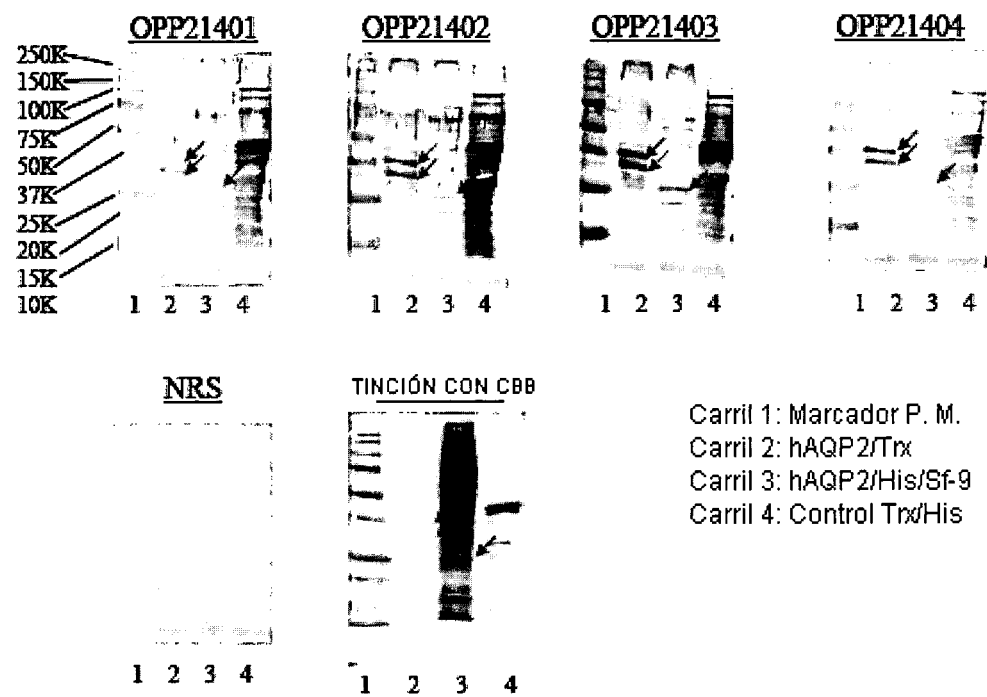
[Fig. 5]



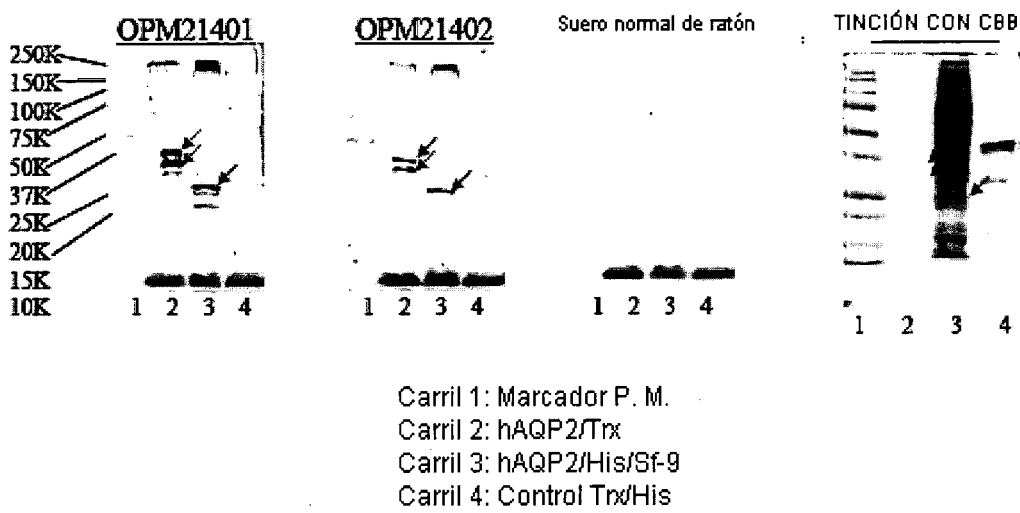
[Fig. 6]



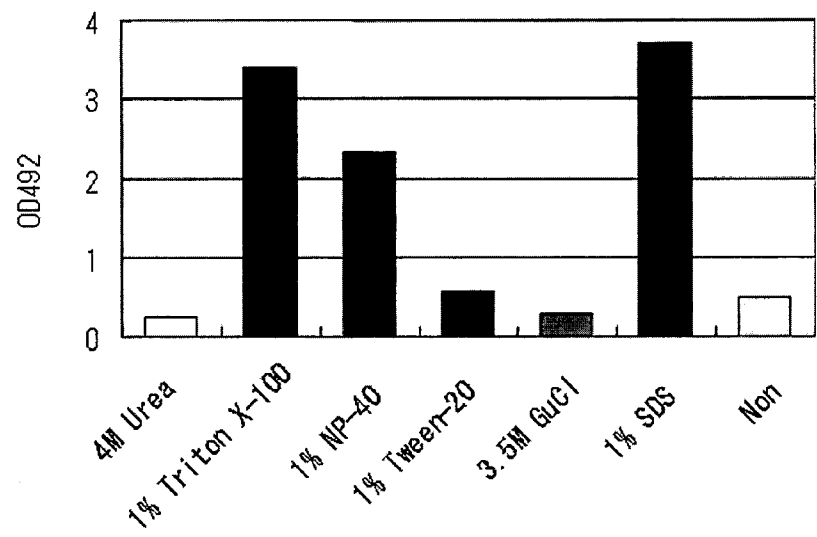
[Fig. 7]



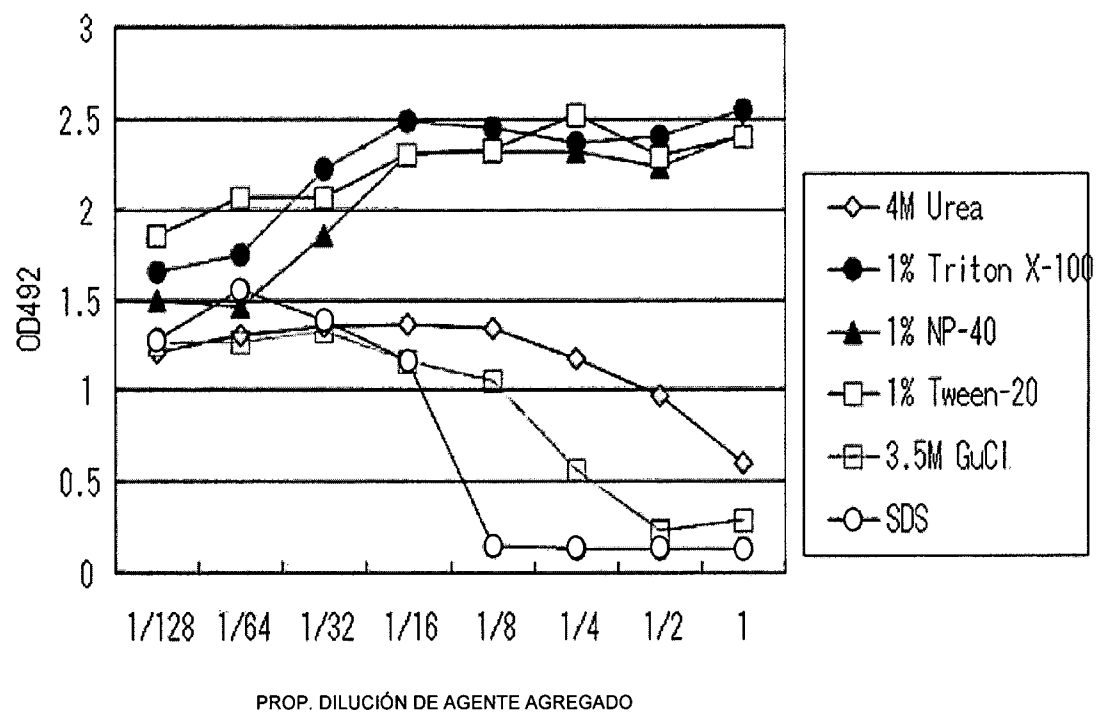
[Fig. 8]



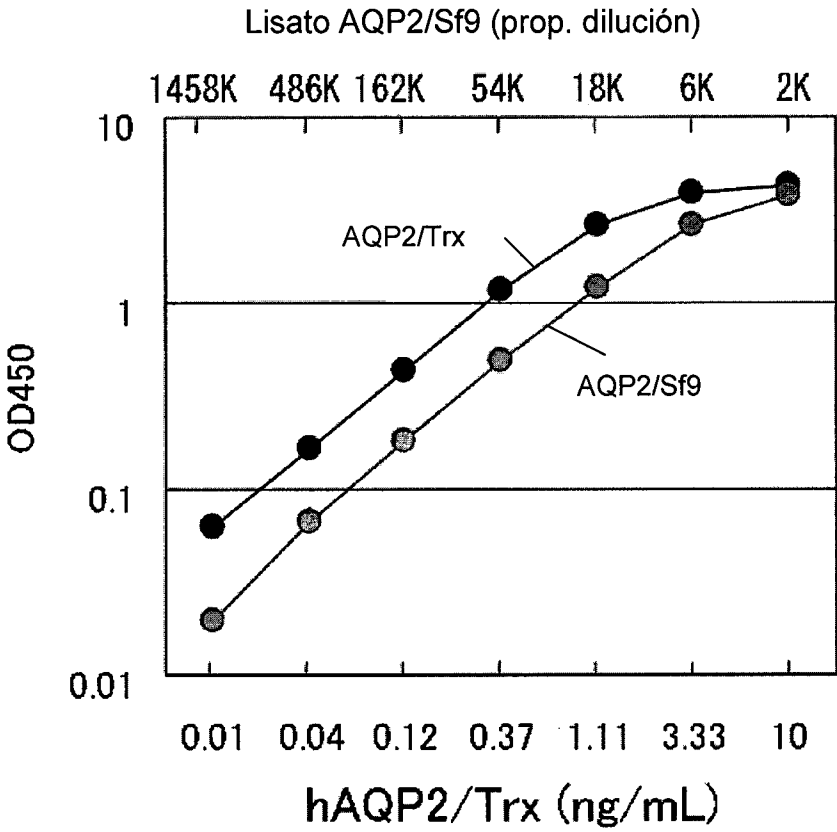
[Fig. 9]



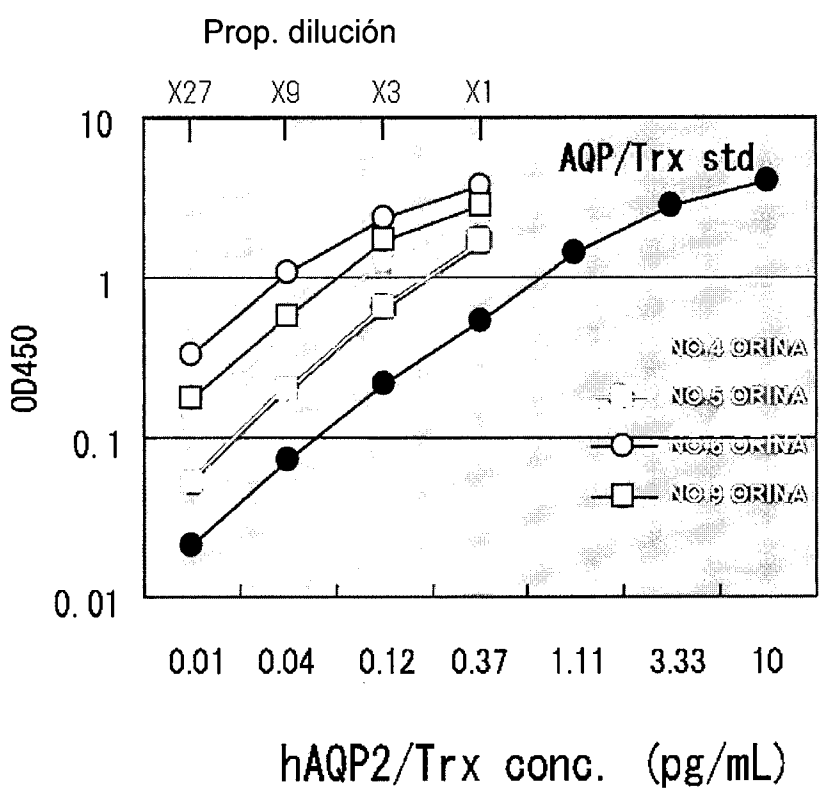
[Fig. 10]



[Fig. 11]

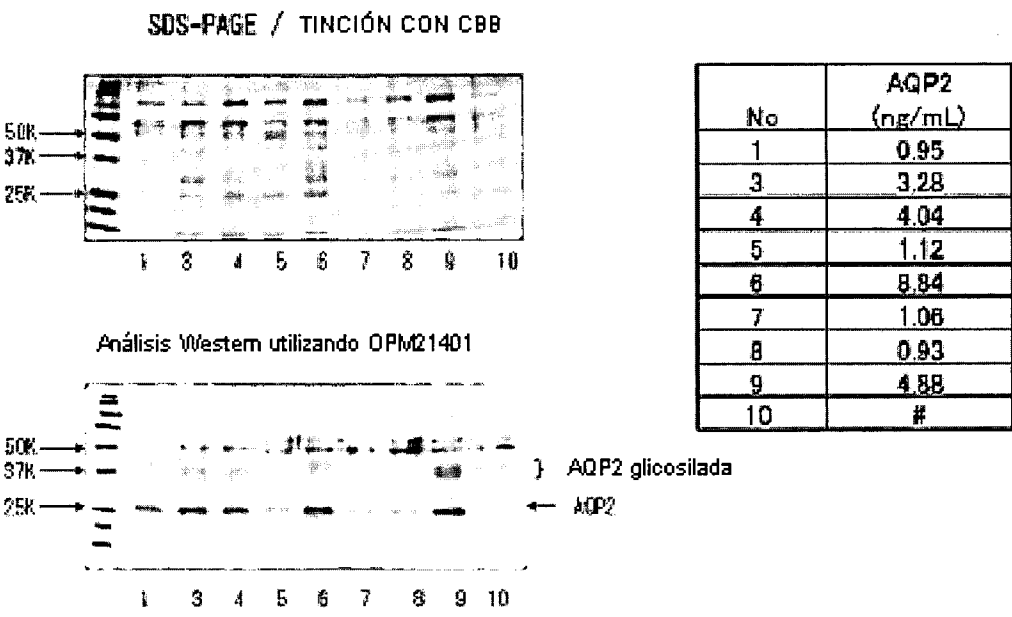


[Fig. 12]

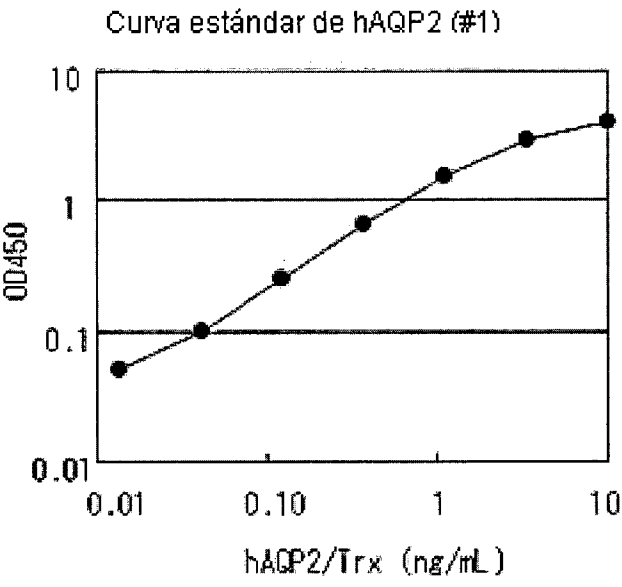


[Fig. 13]

(A) (B)



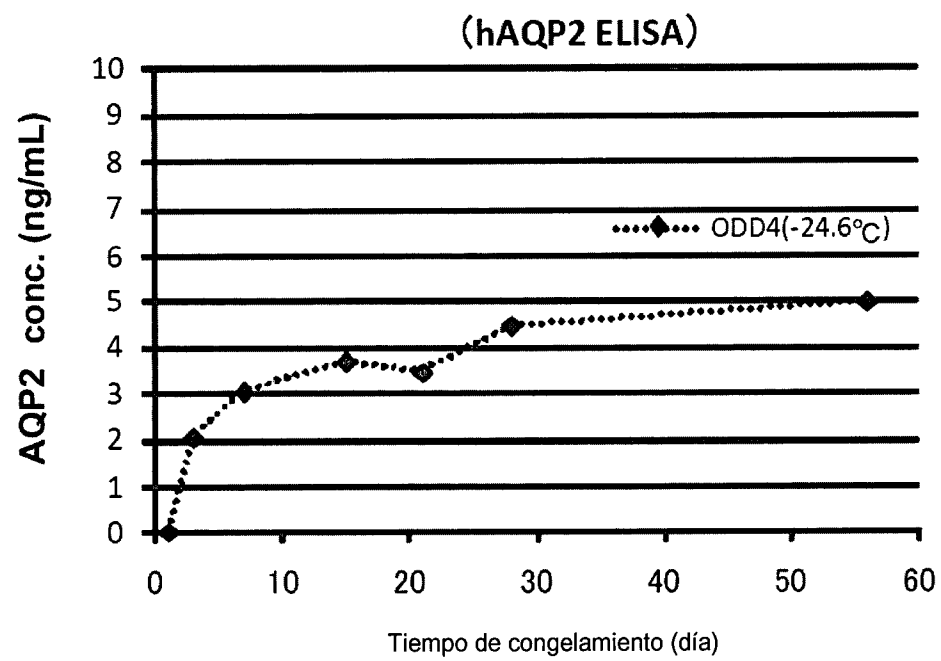
[Fig. 14]



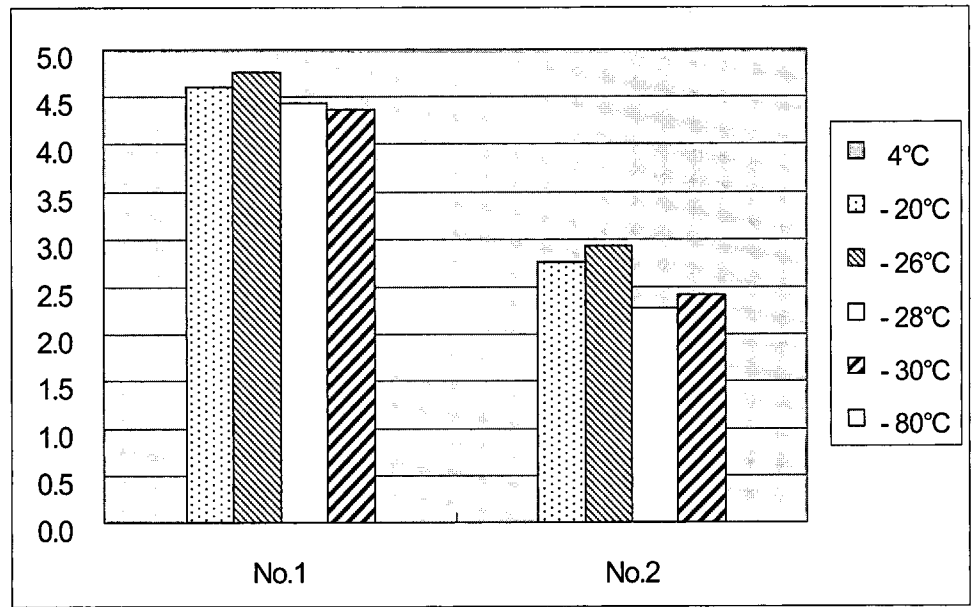
[Fig. 15]

1°				2°				3°				4°				5°			
TEMPERATURA CONSERVACIÓN																			
A	A - 37°C	5>		CONSERVADO	A	1.0	CONSERVADO	8.0	CONSERVADO	6.5	CONSERVADO	10.4							
B	B - 23°C	5>		A.4°C	B	0.7	A.4°C	1.1	A.4°C	1.2	A.4°C	2.5							
C	C - 4°C	5>			C	0.7		1.4		0.0		1.4							
D	D - 30°C	100	→		D	100		100		100		100							
E	E - 80°C	5>			E	4.3		5.6		3.6		5.5							
				CONSERVADO	A	103.5	CONSERVADO	100.8	CONSERVADO	104.3	CONSERVADO	80.6							
				A.-30°C	B	88.6	A.-30°C	95.1	A.-30°C	119.0	A.-30°C	94.6							
					C	78.2		91.7		95.3		82.8							
					D	99.6		103.6		90.3		82.2							
					E	72.8		91.7		92.1		85.7							
				CONSERVADO	A	9.4	CONSERVADO	100.4	CONSERVADO	108.6	CONSERVADO	90.9							
				A.-80°C	B	0.9	A.-30°C	97.5	A.-30°C	113.8	A.-30°C	101.0							
					C	1.9		97.2		106.8		100.4							
					D	90.6		102.3		114.8		104.9							
					E	3.9		100.7		103.9		86.0							

[Fig. 16]



[Fig. 17]



Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

domiciliado (s) en/of 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome,

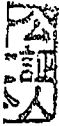
Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan.

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que rue (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos;

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 and GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the



b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

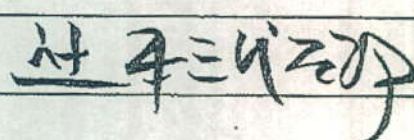
Dado y firmado hoy/Given and signed this 26th of June, 2009
en/in Japan
por/by Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department

Firma

Signature



公証人

登簿平成 21 年第 387 号
当公証人は次の認証をする。
大塚製薬株式会社
知的財産部部長 鮫澤由夫
上記の者は代理人 三枝英二により
当公証人の面前でこの証書の署名を自認した。
上記の会社は日本国東京都千代田区神田司町 2
丁目 9 番地に所在し日本の法律に基づいて設立
された会社であることを東京法務局発行の証明
書によって相違ないことが認められるものであ
る。
平成 21 年 6 月 26 日当公証人役場において
大阪市中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号 (次の欄内)
大阪法務局所属
公証人  


大阪法務局所属 公証人役場

昭和12年

大正

大正

昭和12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

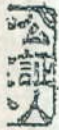
大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日

大正12年12月18日



Registration No. 387-2009

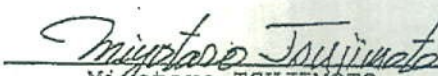
CERTIFICATE

I, the undersigned, hereby certify :

that Eiji SAEGUSA, a proxy for Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department of OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., has stated in my presence that Eiji SAEGUSA has acknowledged as true the signature of Yoshio SAMEZAWA on the attached REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY.

that the abovementioned company is a corporation located at 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan; and was established under the laws of Japan; as verified by the certificate issued by Tokyo District Legal Affairs Bureau.

Dated on this 26th day of June, 2009


Miyotaro TSUJIMOTO
Notary
Osaka Legal Affairs Bureau





総 第 2833 号

証 明

大阪法務局所属公証人

辻本 三代太郎

平成 21 年 6 月 26 日付

平成 21 年 登簿 第 387 号

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

For legalization by the foreign consul in Japan,
this is to certify that the Seal affixed hereto
is genuine.

Osaka, JUN. 26 2009

平成 21 年 6 月 26 日

Official
Ministry of Foreign Affairs...
(Consular Service Division)

大阪法務局長 白石 研



CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official Seal appearing on the same is genuine.

Date JUN. 26. 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

016576

2009 AGO -3 A 10:12

Jose Diaz
Cuya firma aparece en el
documento desempeña
las funciones indicadas.

SECRETARIA DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

Tokio, Japón, JUNIO 30, 2009

No. 173

El encargado de las funciones consulares de Colombia

CERTIFICA:

Que el (a) Señor(a) NORIKO KAWAHITO, quien autoriza el presente documento, es la persona legalmente facultada para representar en la fecha señalada al (a la) MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPON y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son las que usa y acostumbra para sus actos oficiales.

El Encargado de Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Firma del Encargado de Funciones Consulares

JOSE FRANCISCO DIAZ VILLOA
Segundo Secretario

Derechos: US\$30.00

Encargado de Funciones Consulares

83

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.04/09b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., domiciliada en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón, otorga derechos de representación y poder a los Doctores Luz Clemencia de Páez, 23555; Daniel Peña, tpa. 65620 y Germán Marín, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 26 de junio de 2009 en Japón por Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual.

Firma Firma Ilegible

Registro No. 387 - 2009

CERTIFICADO

Yo, el suscrito, por el presente certifico:

que el señor Eiji SAEGUSA, apoderado de Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual de OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., ha declarado en mi presencia que Eiji SEAGUSA ha reconocido como verdadera la firma del señor Yoshio SAMEWAZA en el adjunto documento de Representación y Poder.

que la anterior compañía es una sociedad domiciliada en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón; y que fue constituida de conformidad con las leyes de Japón; como lo constata el certificado expedido por la Oficina de Asuntos Legales de Tokio.

Fecha hoy 26 de junio de 2009

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

Firma ilegible
 Miyotaro TSUJIMOTO
 Notario
 Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Sello: Oficina de Asuntos Legales de Osaka
 NOTARIO
 1-2 HIRANO-MACHI, 2-CHOME,
 CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

TEXTOS EN JAPONÉS

CERTIFICADO

El presente es para certificar que el Certificado Notarial anexo fue suscrito por un Notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha JUN.-26.2009

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Se anexa certificación No.173 expedida por la Sección Consular de la Embajada de Colombia en Tokio, Japón con fecha del 30 de junio de 2009 en donde se certifica la firma anterior del señor NORIKO KAWAHITO como funcionario del Ministerio de Relaciones Exteriores, Japón, así como el sello que aparece en el documento anexo. Certificación firmada por José Francisco Díaz Ulloa, Segundo Secretario de las Funciones Consulares. Pagados los Derechos Consulares.

Legalización de la firma anterior por parte del Jefe de Legalizaciones en Bogotá D.C. del Ministerio de Relaciones Exteriores con número 016576 con fecha del 3 de agosto de 2004.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-155360\WPCL002H\COLO 14055-841-003-5

D. F. V. S.
 DILENIO F. VILLALBA II
 TRADUCCION E INTERPRETACION
 ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS, ESPAÑOL
 RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
 MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE Asume
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2009 AGO 11 A 9:27

019140

JEFE DE LEGALIZACIONES *
BOGOTA D.C.

DIEGO UARGAS
CUYA FIRMA AGENDE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
RECIBO LEGALIZACION 3/3
No. 985583746596.

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY**

domiciliado (s) 5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku,
en/of Tokyo 1138510, Japan

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial e Intelectual, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial and Intellectual Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial

administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 5th of February, 2014

En/in Tokyo, Japan

Por/by Shuki MIZUTANI,
Director, Industry Alliances Division

Firma/Signature

Shi Mizuti

E. S. D.

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

CESION

ASSIGNMENT

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)	I (we), the undersigned
	Please see the attached sheet.
domiciliado(s) en	of
	Please see the attached sheet.
declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)	state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:
de la invención: METODO PARA EL	METHOD FOR PRETREATING BIOLOGICAL SAMPLE
PRETRATAMIENTO DE UNA MUESTRA	CONTAINING PROTEIN
BIOLOGICA QUE CONTIENE PROTEINA	
declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin	state as well, that assign, without reservations or limitations in favour
limitación, a favor de la sociedad	of 1) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., and
	2) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO
	MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY
constituida y existente de conformidad con las leyes de	a corporation constituted and existing in conformity with the laws of
	Japan
domiciliada en	domiciled in
	1) 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan; and
	2) 5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138510, Japan
todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada	all rights inherent to said invention and that the above mentioned
Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de	company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding
invención correspondiente en la República de Colombia.	patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this 4th of February, 2014

en/in Japan

por/by Please see the attached sheet.

Firma/Signature

Please see the attached sheet.

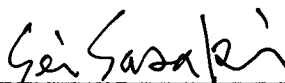
The undersigned

- 1) Sei SASAKI,
- 2) Yasukazu OHMOTO,
- 3) Toyoki MORI,
- 4) Fusako IWATA, and
- 5) Masahiro MURAGUCHI

Domiciled in

- 1) c/o National University Corporation Tokyo Medical and Dental University,
5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138510, Japan; and
- 2)-5) c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.,
1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japan

Singed



Sei SASAKI

Yasukazu OHMOTO

Toyoki MORI

Fusako IWATA

Masahiro MURAGUCHI

CESION		ASSIGNMENT	
Yo, (nosotros) abajo firmado (s)		I (we), the undersigned	
		Please see the attached sheet.	
domiciliado(s) en		of	
		Please see the attached sheet.	
declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)		state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:	
de la invención: METODO PARA EL		METHOD FOR PRETREATING BIOLOGICAL SAMPLE	
PRETRATAMIENTO DE UNA MUESTRA		CONTAINING PROTEIN	
BIOLOGICA QUE CONTIENE PROTEINA			
declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin		state as well, that assign, without reservations or limitations in favour	
limitación, a favor de la sociedad		of 1) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., and	
		2) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO	
		MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY	
constituida y existente de conformidad con las leyes de		a corporation constituted and existing in conformity with the laws of	
		Japan	
domiciliada en		domiciled in	
		1) 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535,	
		Japan; and	
		2) 5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138510, Japan	
todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada		all rights inherent to said invention and that the above mentioned	
Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de		company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding	
invención correspondiente en la República de Colombia.		patent invention, in the Republic of Colombia	

Dado y firmado hoy/Given and signed this 4th of February, 2014
en/in Japan
por/by Please see the attached sheet.
Firma/Signature Please see the attached sheet.

The undersigned

- 1) Sei SASAKI,
- 2) Yasukazu OHMOTO,
- 3) Toyoki MORI,
- 4) Fusako IWATA, and
- 5) Masahiro MURAGUCHI

Domiciled in

- 1) c/o National University Corporation Tokyo Medical and Dental University,
5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138510, Japan; and
- 2)-5) c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.,
1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japan

Singed

Sei SASAKI

Yasukazu Ohmoto
Yasukazu OHMOTO

Toyoki Mori
Toyoki MORI

Fusako Iwata
Fusako IWATA

Masahiro Muraguchi
Masahiro MURAGUCHI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0019339

Bogotá D.C., Febrero 19 de 2014 - 14:24:22

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	651470816	19/02/2014	11.526.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01	SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-049592-00000-0000

Fecha: 2014-03-07 17:07:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95

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

Febrero 19 de 2014 - 14:24:26

0020: 20893-841-001-5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0021777

Bogotá D.C., Febrero 25 de 2014 - 16:49:03

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	651483932	25/02/2014	19.213.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
3	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	93.000.00
				\$93.000.00

SON: **NOVENTA Y TRES MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-049592- -00000-0000

Fecha: 2014-03-07 17:07:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95

0010: 20893-841-001-5

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: G01N 033/543	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. Y NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 2011/166272	(32) Fecha 2011/08/11	(33) País JP
		(72) Inventor(es) SEI SASAKI Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 201/03/11		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 2013/02/14
	Fecha de presentación de la solicitud: 2012/08/10		N° publicación: WO 2013/022107 A1
	No. de solicitud PCT/JP2012/070570		
(54) Titulo: MÉTODO PARA EL PRETRATAMIENTO DE UNA MUESTRA BIOLÓGICA QUE CONTIENE PROTEÍNA			

Resumen:

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

PATENTE DE INVENCION ☐



No. 14-049592- -00000-0000

Resolución 486/00

Fecha: 2014-03-07 17:07:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95

☐	Indicación que se solicita
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐