



83.339

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 05076267 00000002

Folios: 50

Fecha (VCD): 2000-12-29 12:38:06

Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO 329 COMPLETOS

Dependencia: 8909 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONESCONTESTACION A REPAROS - OBSERVACIONES
APORTACION DE NUEVA DOCUMENTACION A
UNA SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION O
MODELO DE UTILIDAD O DISEÑO INDUSTRIALSolicitud de Patente
Expediente No. 00 076.267CONTESTACION: Reparos ☐
Observaciones ☐
Otros ☐NUEVA DOCUMENTACION APORTADA ☒☒ PATENTE☐ MODELO DE UTILIDAD☐ DISEÑO INDUSTRIALTITULO: **ENSAYO DE INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA DE INHIBICION (ELISA) PARA
DETECCION Y CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS EN MUESTRAS BIOLOGICAS**SOLICITANTE: **PHARMACIA CORPORATION**

INDICE DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

- | | |
|---|--------------------------|
| ☒ Copia certificada por la Oficina de Patentes de | ☐ |
| ☐ Estados Unidos de la primera solicitud presen- | ☐ |
| ☐ tada para la misma invención, de la cual REIVIN- | ☐ |
| ☐ DICAMOS PRIORIDAD, junto con su correspondiente | ☐ |
| ☐ traducción al español. | ☐ |
| ☐ | ☐ |

APODERADO: **RAMIRO CASTRO DUQUE** Código - 340DOMICILIO: **Cra. 7 No. 16-56 Piso 9**TEL: **2-812424**

FIRMA:

NUMERO DE HOJAS **50**

RADICADO POR: Nombres y Apellidos

Diciembre 29, 2000
CPB/hsr.

83339 #20
71 +22

PA 317433



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

October 18, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/158,090

FILING DATE: October 07, 1999



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

N. WOODSON

Certifying Officer

10/07/99
JCS53 U.S. PTO

Please type a plus sign (+) inside this box → ☒

Approved for use through 12/1/98. OMB 0551-0037
Patent and Trademark Office, U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.63 (c).

INVENTOR(S)					
Given Name (last and middle (if any))	Family Name or Surname	Residence (City and other State or Foreign Country)			
Mark A.	Abrams	St. Louis, MO			
☐ Additional inventors are being named on the _____ separately numbered sheets attached hereto					
TITLE OF THE INVENTION (200 characters max)					
INHIBITION ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF ANTIBODIES IN BIOLOGICAL SAMPLES					
Direct all correspondence to:		CORRESPONDENCE ADDRESS			
☐ Customer Number				Place Customer Number Bar Code Label here	
OR		Type Customer Number here			
☒ Firm or Individual Name	Patent Department Central, Monsanto/G.D. Searle				
Address					
Address	PO Box 5110				
City	Chicago	State	IL	ZIP	60680-5110
Country	USA	Telephone	(314) 737-6257	Fax	(314) 737-6972
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)					
☒ Specification Number of Pages	21	☐ Small Entity Statement			
☒ Drawing(s) Number of Sheets	8	☐ Other (specify)			
METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT (check one)					
☐ A check or money order is enclosed to cover the filing fees				FILING FEE AMOUNT (\$)	
☒ The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: 19-1025				150	
The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.					
☒ No.					
☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____					

Respectfully submitted,

SIGNATURE



Date

10/7/99

TYPED or PRINTED NAME S. Christopher Bauer

REGISTRATION NO.

42,305

(if appropriate)

TELEPHONE (314) 737-6257

Docket Number:

50-3187

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.5 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Box Provisional Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

122
73
424

ABSTRACT

The present invention is a specific and sensitive method of detecting antibodies in biological samples. This method of inhibition enzyme linked immunosorbent assay (iELISA) is generally applicable for the detection of antibodies found in biological fluids. The inhibition ELISA immunoassay (iELISA) of the present invention greatly increases the sensitivity, specificity, and convenience of obtaining serologic data. The present invention also relates to a test kit for use in an immunoassay to detect an antibody to an antigen in a test sample.

601580 0.1007

INHIBITION ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (iELISA)
FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF ANTIBODIES
IN BIOLOGICAL SAMPLES

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to an inhibition enzyme linked immunosorbent assay (iELISA) for detecting and quantifying antibodies in biological samples.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention is a specific and sensitive method of detecting antibodies in biological samples. This method of inhibition enzyme linked immunosorbent assay (iELISA), was developed, in particular, for the detection of antibodies to recombinant polypeptides in serum. This method, however, is generally applicable to the other antigens and their corresponding antibodies found in biological fluids and tissues such as tears, saliva, urine, milk, semen, and vaginal secretions.

Many immunoassay techniques exist for the immunosurveillance of antigens and antibodies. Direct ELISA assay and protein Western electrophoretic assays are among the most sensitive. However, one of the drawbacks of these procedures is the background interference caused by non-immune immunoglobulin and other serum factors present in all normal sera. This background, by its tendency to overlap and obscure low levels of specific reactive immunoglobulin, decreases the sensi-

75 124
125

5 tivity of the assay and creates the need for supplementary confirmation tests in order to demonstrate true positivity. One such confirming test used extensively is the protein Western blotting procedure which, although sensitive, more specific, and informative for distinct proteins, is highly labor intensive, difficult to interpret, and is qualitative in nature, rather than quantitative.

10 Competition ELISA immunoassays exist for detection and quantification of antigens and antibodies in serum which have increased the sensitivity, specificity, and convenience of obtaining serologic data.

15 EP 202 890 describes a competition ELISA immunoassay for detecting human T-cell leukemia-lymphoma virus type III (HTLV-III).

US 5,798,219 describes a competition ELISA immunoassay for detecting antibodies to rickettsial diseases of cattle, sheep, and goats.

20 EP 353 822 B1 discloses a competition ELISA immunoassay for detecting malaria infections caused by a protozoon of the *Plasmodium* genus.

25 However, these methods can also have considerable background, require large quantities of purified antigen for coating, require a labeled secondary detection antibody, and have numerous steps which are time consuming and labor intensive.

30 The inhibition ELISA immunoassay (iELISA) of the present invention greatly increases the sensitivity, specificity, and convenience of obtaining serologic data. The method increases sensitivity of specific antibody measurements by eliminating the background

661580 0-100799

76 125
x2

associated with binding of non-specific immunoglobulin. The method increases specificity by incubating the affinity purified antibody and labeled antigen simultaneously with the test serum. The present method
5 reduces assay time and labor requirements as a consequence of the elimination of the secondary detection step.

SUMMARY OF THE INVENTION

10

Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), in general, are performed by binding either antigen or antibody as a reference reagent to a solid phase
15 support. Test sample is then reacted with the bound reference reagent. The reagents undergo a series of dilution, incubation, and washing steps in order to separate bound and free reagents. The process concludes with a detection step, compatible with the type of label used, designed to
20 indirectly measure the amount of antibody (or antigen) in the test sera.

A novel method is described for the detection and measurement of antibodies in serum. The advantage of
25 this assay method is that it reduces or eliminates false positives and decreases assay incubation time by eliminating the need for a separate detection step. This invention is an inhibition assay, which differs from direct binding assay formats in that it allows for the
30 inhibition of bound specific affinity purified antibody and test sera antibody for labeled antigen. This avoids elevated backgrounds caused by non-specific binding of

601580 0.100799

77 X26
A28

secondary detection antibodies to antigen bound to a solid phase, as in the sandwich assay. A second advantage of this assay is that it allows for the determination of concentration in serum in addition to
5 titer dilution of antibodies. A third advantage is a reduction in assay time as a consequence of the elimination of the secondary detection step.

One aspect of this invention is to provide a method
10 for the detection of antibodies to recombinant polypeptides in serum. This is an important because increasing concentrations of specific antibody to a recombinant protein could have a neutralizing effect on both drug and the drug target. Typically, the levels
15 of circulating antibody to drugs in the serum are very low. The method of the present invention, inhibition enzyme linked immunosorbent assay (IELISA) allows for sensitive, accurate, and rapid detection of antibodies to recombinant proteins.

20 This method is, however, generally applicable for detecting antigens and their corresponding antibodies in serum. There are many important potential uses for a simple method for the detection of antibody .
25 concentrations in sera. Normal plasma from normal donors can be screened for higher than normal concentrations of naturally occurring antibodies to known pathogens. One could easily test sera from humans or animals that have been vaccinated with a particular
30 virus, for example the rabies virus, and quickly determine if titers were sufficiently elevated to give protection against infection.

60158090.100799

127
~~128~~
78

Another aspect is to provide a kit for the rapid screening and detection of antibodies.

5 Another aspect of the invention is the use of the assay in epidemiological studies in regions where a particular pathogen infects one or more species endemic to that region. A field ELISA test kit for detecting serum antibody levels would be amenable for accurately
10 determining particular species involved and rates and spread of infection and could be an important tool in control efforts.

Another aspect of the invention are multitudinous
15 in vitro applications for an inhibition ELISA that could detect antibody levels from experimental tissue culture media or purification samples or the detection of antibody level in biological fluids other than serum such as urine, saliva, lymph, tears, milk, semen,
20 vaginal secretions, or spinal fluid.

Another application of this method is for the detection of virus, including but not limited to, human T-cell leukemia-lymphoma virus type III (HTLV-III), the
25 causative agent of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). This method is also applicable to the detection of other pathogenic organisms including but not limited to bacteria, yeast, fungus, and parasites. In addition, this method can be used for detecting antibodies raised
30 in response to vaccines.

60158090-100799

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 schematically shows a standard direct binding sandwich ELISA compared to one form of the inhibition ELISA of the present invention.

Figure 2 shows antibody titers from serum samples from rhesus monkeys treated with a recombinant protein over a six month period. Rhesus monkeys were immunized with 100 µg/kg of myelopoietin (MPO), a member of a family of recombinant proteins which are multifunctional agonists of human interleukin-3 (IL-3) and human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) receptors (WO 95/21197 and WO 95/21256), with 0.5 mg/kg Titermax (adjuvant from Hyclone Company) subcutaneous administration on day 1 and boosted on days 21, 42, 63, 84, 105, 126, and 147. Spike controls consisted of normal rhesus serum with addition of 4 µg/ml affinity purified goat anti-MPO which is then serial diluted 1:2 to generate a standard curve..

Figures 3 and 4 show serum antibody titers from breast cancer patients (chemotherapeutic agent was docetaxel, 100 mg/m² on day 1) treated with 5.0 µg/kg/day of MPO. The control is normal human serum with the addition of 4 µg/ml affinity purified goat anti-MPO diluted as above.

Figure 5 shows serum antibody titers from lymphoma cancer patients (Chemotherapeutic regimen was ESHAP-etoposide, methylprednisolone, cisplatin, cytosin arabinoside, *Journal of Clinical Oncology*, 13:1734-1741.

124
131
80

1995) treated with 7.5 µg/kg/day of MPO. Control standard is normal human serum with the addition of 4 µg/ml affinity purified goat anti-MPO.

5 Figure 6 shows serum antibody titers from normal female rhesus monkey immunized with promegapoeitin (PMP), a member of a family of recombinant proteins which are multifunctional agonists of human IL-3 and human c-mpl receptors (WO 97/12985) 50 µg/kg/day with
10 0.5 mg/kg subcutaneous injections for 10 days.

 Figure 7 shows serum antibody titers from a human male sarcoma cancer patient treated with 0.5 µg/kg/day for five days for 3 cycles with PMP. Control is normal
15 human serum with the addition of 4 µg/ml affinity purified goat anti-PMP.

 Figure 8 demonstrates the antibody is being detected by the removal of IgG by Protein G from the
20 serum. Anti-PMP titers were measured in a patient in Cycle 1 of the chemotherapy at Day 1 with no titer as a negative control and at Day 22 with positive titer before and after Protein G treatment for 1 hour at room temperature. Various concentrations of affinity purified goat anti-PMP antibody
25 was added to normal serum as a positive control.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

 The invention described is an inhibition ELISA. In
30 the preferred embodiment, as shown in Figure 1, the affinity purified specific antibody (primary antibody) is bound to a 96-well microtiter plate, which is then

60158090.100799

66400T-D6085709

5 exposed to a predetermined concentration of labeled antigen and a solution containing an unknown concentration of test sample antibody (secondary antibody). The microtiter plate containing the antigen-antibody mixture is incubated to allow the primary and secondary antibodies to compete for binding of labeled antigen. After washing thoroughly to remove unbound antigen and secondary antibody-antigen complex, measurement of bound labeled antigen that was not removed by competition with the secondary antibody, is determined by the addition of a substrate which yields a chromogenic product. The amount of chromogen produced is directly related to the amount of labeled antigen bound to the primary antibody and the percent inhibition of labeled antigen by the unknown concentration of secondary antibody. The percent inhibition is determined by a graphic transformation of the absorbance readings and the 50% inhibition concentration (IC50) of this curve is used to determine titer of the secondary antibody in the unknown solution.

25 One could also envision a similar assay in which antigen is coated to a microtiter plate and labeled primary antibody, either monoclonal or affinity purified, compete with unknown test solution antibody for binding to the precoated antigen.

30 It is also envisioned that the assay could be performed in solution by separating the primary antibody and the unknown secondary antibody. This may be accomplished by labeling the antigen or primary antigen with a magnetic tag or attaching them to agarose and then using a magnetic field and centrifugation, respectively, to separate them.

131
133
32

The assay may also be performed by binding antibody to binding surfaces other than microtiter plates. For example, antibodies could bind to small Biacore sensor chips (BR-1000-14) coated with affinity molecules such as Protein A or G or carboxymethyl dextrans. Additionally, other binding surfaces such as small agarose beads or magnetic beads could also be anticipated as being employed in the assay.

One could envision the use of the iELISA in kit form. Antibodies against specific antigens could be precoated on plates followed by blocking of non-coated solid surface. These plates would then be stable, and could be stored at 4°C for several months. Peroxidase labeled antigen is also stable for several months at 4°C. Test samples could be added anytime within this window of reagent stability in a research or clinical setting.

MATERIALS AND METHODS:

Production of polyclonal antisera:

Purified soluble antigens are generally mixed with an adjuvant to help enhance the immune response by stimulating various cellular components of the immune system. Typically, Freund's adjuvant (FA, Difco Laboratories) is used. Freund's adjuvant is a mineral oil with a stabilizer to yield stable water-in-oil emulsions. Complete Freund's Adjuvant (CFA, Difco Laboratories) contains a dispersion of dried, heat killed *Mycobacterium tuberculosis* and causes formation of local granulomas which are rich in macrophages and immunocompetent cells. Immunizations are routinely

664007-0 085109

132
x3A
83

performed using CFA with subsequent boosts in FA at intervals of one month. Intramuscular inoculations for goats are generally performed in the thigh muscle of the hind leg followed by subcutaneous boosts to decrease the chances of an anaphylactic reaction. Test bleeds should be drawn approximately 10 days after each boost until desired titer is obtained. Screening of test bleeds could be performed by ELISA, Westerns, or Ouchterlony agarose double diffusion precipitin assays.

10

Affinity Purification

Antibodies are routinely purified from tissue culture media for monoclonals or, from serum for polyclonals, using affinity chromatography methods. One such method employs the use of Protein A isolated from culture media of *Staphylococcus aureus* immobilized on sepharose beads. Protein A has an extremely high affinity for IgG and IgG sub-classes from a variety of mammalian species and will also bind to some IgA and IgM antibodies (Kronvall, G., et al. *J. Immunol.* 104:140-147, 1970). To purify antigen specific antibodies, protein antigen ligands are coupled to activated immunoaffinity supports via primary amines. The gel containing approximately 5-10 mg antigen per ml resin, is then packed into a column and the solution containing the desired antibody is slowly passed over the column, followed by washing, to remove weakly bound non-specific proteins. The specific antibody is then eluted. Acid elution is the most commonly employed desorption method. Eluants such as glycine-HCl pH 2.5, 20 mM HCl, sodium citrate pH 2.5, 0.5 M acetic acid pH 2.5 are routinely used to dissociate the antigen-antibody complexes. Base

601580 0-10079

133
135
84

elution such as 50 mM diethylamine pH 11.5, and elution with chaotropic agents, are less frequently used than acid elution, but in some cases, they are more effective.

5

Enzyme Labeling of antibodies and antigens

Widely used methods for detecting immunoassay antigen-antibody complexes involve the labeling of either the antigen or the antibody with a radioisotope, fluorescent tag, or an enzyme. Obvious safety and disposal concerns have increased the popularity of enzyme-linked immunoassays. There are three enzymes generally used with ELISA's. The earliest was alkaline phosphatase and the most commonly used now is horseradish peroxidase. The third is beta-galactosidase. Phosphatase or galactosidase are used in situations where there may be endogenous peroxidase activity in the antigen. Conjugation is by a variety of methods. Two of the more commonly used cross linking methods involve the use of glutaraldehyde (GA) (O'Sullivan, M.J. and Marks, V., *Meth. Enzymol.* 73:147, 1979) and periodate (NaIO_4) (Nakane, P.K., and Kawaoi, A., *J. Histochem. Cytochem.* 22:1084, 1974) the latter being very efficient for glycoproteins. This method has been most significant for the development of ELISA's due to its high efficiency compared to the GA methods. With the NaIO_4 method, yields are at least 3 to 4 times higher than the conjugates prepared with GA. The NaIO_4 method was originally used for the conjugation of horseradish peroxidase to antibodies but may also be applied to other glycoproteins such as various cytokines.

6015 0 0 100799

134
126
85

Another more recent method of labeling is with biotin and avidin. Commonly, proteins are labeled with biotin and avidin is tagged with either alkaline phosphatase or horse raddish peroxidase. Biotin-avidin
5 complexes have a high binding affinity which can be used as a tool to greatly enhance the detection signal.

Antibody generation

Anti-MPO and anti-PMP antiserum were developed in
10 goats. Goats were chosen as animal of choice for antibody production because large volumes of antisera could be generated in a relatively short period of time. The goats were immunized with MPO and PMP antigens as follows. Antigen was diluted to a concentration of 1.0
15 mg/ml phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, and was then mixed with an equal volume of CFA. The animals were given intramuscular injections in the rear hind quarter. After four weeks, the goats were boosted with 0.5 mg of antigen mixed one to one with FA and then bled on day
20 ten to check for antibody titer. Antibody titers were assessed using agarose double diffusion technique of Ouchterlony (Arkiv. Kemi Mineral Geol., 263 (14):1-9, 1948) with plates obtained from ICN Biomedicals, Inc., (642751). Goats were given booster injections and bled
25 every 4 weeks.

Affinity purification of antisera

Antibody was affinity purified using immobilized antigen at 15 mg/ml AffiGel 10 resin. Purified antigen
30 was dialysed into 3 ml 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.5, containing 150 mM sodium chloride. After dialysis against a 5000-fold excess of phosphate buffer, washed

667001-06085109

AffiGel (1 ml/15 mg protein) was added to the antigen solution and allowed to incubate overnight at 4°C with slow rotation. Blocking of remaining active esters was achieved by the addition of 0.1 ml 1 M glycine ethyl ester pH 8.0 (Sigma G-8001) per ml of gel for one more hour at 4°C. The gel was then transferred to a column and washed extensively with coupling buffer. The goat anti-sera was then diluted 1:1 with PBS and pumped onto an affinity column at a flow rate of 0.5 ml/min.

Affinity purified antibody was eluted from the column with 0.5 M acetic acid pH 2.5 elution buffer, collecting into 1:10 volume 10 X phosphate buffered saline buffer to neutralize the pH. A final pH adjustment to 7.0 was made with NaOH. Approximately one mg of specific antibody was obtained per ml of serum.

Preparation of enzyme labeled antigen conjugate

The following conjugation reagents were purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri: sodium m-periodate (S-1878), sodium borohydride (S-9125), and horseradish peroxidase type XII (P-8415). AffiGel-10, an active ester agarose used for affinity chromatography, was purchased from Bio Rad (153-6099). MPO and PMP were labelled with horse radish peroxidase (HRP) according to the method described by Nakane, et al. (*J. Histochem. Cytochem.* 22:1084-1091, 1974). Briefly, 5.0 mg/ml of purified MPO was dialyzed into 10 mM carbonate/bicarbonate buffer pH 9.5. HRP was dissolved in 2 ml distilled water at 10 mg/ml and 0.1 ml of a 0.2 M sodium periodate solution was added and allowed to stir for 20 minutes, room temperature (on addition of the sodium periodate, there is a color

136
138
39

change from brown to green). Next, the HRP-aldehyde solution was dialyzed against 1 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 at 4°C, for four hours with 5-6 buffer changes (color changes back to green). The HRP-aldehyde was adjusted between pH 9-9.5 by the addition of 20ul of 0.2 M carbonate buffer pH 9.5, and 5 mg of MPO was immediately added to this solution. The pH of the mixture was rechecked and adjusted to pH 9-9.5, if necessary, and then incubated for two hours at room temperature. The mixture was then reduced by the addition of 0.05 ml sodium borohydride, 4 mg/ml, to give a final concentration of about 0.18 mg NaBH₄/ml and allowed to stand for two hours at 4°C with occasional shaking. The reaction mixture was then dialyzed overnight against 2000-5000 times its volume of PBS at 4°C. For storage, the antigen/HRP conjugate was mixed with bovine serum albumin (BSA final concentration 5 mg/ml) and 0.01% thimerosal (Sigma, T-5125) as a preservative.

Performance parameters

To determine the appropriate assay conditions, checkerboard ELISA's were performed by spiking various concentrations of affinity purified goat antibody into human serum from 5 normal donors and allowing it to compete with a constant amount of solid matrix absorbed affinity purified goat antibody for the binding sites of HRP labeled MPO or PMP. In a checkerboard ELISA, antigen concentrations are diluted in one direction on a microtiter plate, and antibody is diluted in the other direction. Optimum concentrations are selected based on predetermined criteria for time of development, maximum

601580 0.100799

desired optical density (OD) and minimum noise to signal ratio. Results were plotted as either the concentration of competing antibody vs. OD_{max} or as dilution vs. OD_{max}. It was determined that a coating antibody concentration of 0.25 µg/ml was limiting enough to allow for adequate competition for 10 ng/ml of HRP-MPO. Starting dilution of human patient serum was diluted 1:100 to eliminate any serum matrix effect and then serially diluted to 1:102,400. Optimally, the desired combination of coating antibody, serum antibody, and HRP conjugated MPO or PMP, would produce an optical density of 0.5-1.0 at 650nm in approximately 15 minutes at room temperature for the upper limit of the standard curve.

15 *Inhibition enzyme linked immunosorbent assay (iELISA)*

Bovine serum albumin (BSA RIA grade, fraction V) used in assay buffers, was purchased from Sigma (A-7888). For the ELISA, Immulon II, polystyrene 96-well microtiter plates (Dynatech), and TMB peroxidase substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (50-76-04) were used. Tween 20 was purchased from Sigma (P-1379). Polystyrene 96-well microtiter plates were precoated with 150 µl/well of a 0.25 mg/ml affinity purified goat anti-MPO or PMP antibody solution diluted in 0.1 M sodium carbonate buffer pH 8.2, and allowed to bind overnight at room temperature, 100% humidity. The plates were then emptied to remove unbound antibody and blocked with the addition of 200 µl/well 3% BSA-10 mM phosphate buffered saline-0.05% tween 20 pH 7.4, for one hour at 37°C, and 100% humidity. The unbound blocking agent was then removed and the plates were washed three times with 0.05% tween-isotonic saline (TS). Next, 75

667007-0608505
50158090-100799

5 μ l/well of human serum diluted 1:50 (1:100 final) was added to the appropriate wells diluted in 0.1% BSA-10mM PBS-0.05% tween 20. Then 75 μ l of HRP/Antigen at a 1:50,000 (1:100,000 final) was added to each well and the coated antibody and antibody in the serum were allowed to compete for HRP/MPO for 2 hours at 37°C and 100% humidity. The plates are then emptied to remove unbound conjugate and washed three times with TS. In the next step, a colorimetric reaction was performed to determine the bound peroxidase activity by addition of 150 μ l/well of TMB peroxidase substrate solution to each well and allowing the reaction to proceed for approximately 15 minutes. Finally, the absorbance of the resultant blue color was measured by an ELISA autoreader (Dynatech, U.S.A.) at 650 nm.

EXAMPLES

20 *Example 1 Measurement of MPO antibodies in Rhesus monkeys*

25 The myelopoietin (MPO) family of proteins are multifunctional agonists of the human IL-3 and G-CSF receptor complexes and were developed to produce a significant attenuation in neutropenia and thrombocytopenia in patients receiving myelosuppressive cancer therapy. It is critical, when administering protein therapeutics, to determine if antibodies are being generated that may have important clinical significance such as neutralization.

30 The iELISA assay was to determine the serum antibody titers of a rhesus monkey immunized and boosted over a

139
14
90

6.5 month period with MPO. Immunization consisted of subcutaneous injections of 100 µg/kg MPO with 0.5 mg/kg Titermax (adjuvant) with subsequent 100 µg/kg boost on days 21, 42, 63, 84, 105, 126, and 147. Serum was
5 obtained and then added to the assay at a 1:100 dilution and then serially diluted 1:2 for 10 dilutions to determine titers. Results suggest that titers first appear around day 14 and reach a peak between 2.5 and 5 months. For a positive control, affinity purified goat
10 anti-MPO was added to normal rhesus serum at 4 µg/ml and then serially diluted 1:2 (Figure 2).

Example 2 Measurement of MPO antibodies in cancer patients

15 Serum from MPO-treated cancer patients were analysed to determine if they were producing antibodies to MPO. Breast cancer patients were given 5.0 µg/kg/day MPO after various cycles of docetaxel chemotherapeutic
20 treatment and lymphoma patients were given 7.5 µg/kg/day MPO after receiving ESHAP chemotherapeutic regimen. Results of cancer and lymphoma patients treated with MPO showed either no anti-MPO antibodies or slight titers of less than 1:500 using an IC50 calculation (Figures 3-5).

25

Example 3 Measurement of PMP antibodies in rhesus monkeys

The iELISA was used to determine antibody titers in
30 another class of hematopoietic growth factors. Promegapoietin (PMP), a dual receptor agonist for the IL-3 and thrombopoietin (TPO) receptors, has

661580 D-100799

140
142
91

demonstrated enhanced recovery from chemotherapy induced thrombocytopenia.

We first examined serum from normal rhesus monkeys immunized with PMP subcutaneously for 10 days with 50 $\mu\text{g/kg/day}$. A titer was first detectable at day 21 (Figure 6).

Example 4 Measurement of PMP antibodies in cancer patients

10

Serum from a male sarcoma patient treated with 3 cycles of 0.5 $\mu\text{g/kg/day}$ PMP for 5 days was analyzed for antibodies. With the iELISA, an increased antibody titer to PMP with subsequent treatment cycles was detected (Figure 7). With increasing concentrations of specific PMP antibody a neutralizing effect on both drug and endogenous growth factor could result inducing thrombocytopenia.

Example 5 Demonstration that the iELISA was measuring antibody in the serum

To demonstrate that the iELISA was indeed measuring antibody in the patient serum, positive titer serum was pre-treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ Protein G for 1 hour to remove any IgG from the serum and then samples were assayed before and after Protein G treatment. Results clearly show that after the addition of Protein G, serum antibody levels return to baseline levels of pretreatment serum (Figure 8).

50158090.100799

141
T43
92

There are many important potential uses for the simple detection of antibody titers in sera. Normal plasma from normal donors can be screened for higher than normal titers of naturally occurring antibodies to known pathogens. One could easily test sera from humans or animals that had been vaccinated with a particular virus, for example the rabies virus, and quickly determine if titers were sufficiently elevated to give protection against infection.

The assay may lend itself to epidemiological studies in regions where a particular pathogen infects one or more species endemic to that region. A field ELISA test kit for detecting serum antibody levels would be amenable for accurately determining particular species involved and rates and spread of infection and could be an important tool in control efforts.

One could also imagine many other *in vitro* applications for an inhibition ELISA that could detect antibody levels from experimental tissue culture media or purification samples or the detection of antibody level in biological fluids other than serum such as urine or lymph or spinal fluid.

All references, patents or applications cited herein are incorporated by reference in their entirety as if written herein.

Various other examples will be apparent to the person skilled in the art after reading the present disclosure without departing from the spirit and scope of the invention. It is intended that all such other examples be included within the scope of the appended claims.

667001-06085109

142
93

WHAT IS CLAIMED IS:

- 5 1. A method for the detection of a first antibody
 in a test sample, comprising the steps of:
 coating a binding surface or support with a
 purified second antibody to form an antibody-coated
 surface;
 combining a predetermined amount of a purified
10 labeled antigen and said test sample containing said
 first antibody;
 adding the incubated mixture of antigen and first
 antibody to said antibody-coated surface;
 incubating said antibody-coated surface with said
15 combination of antigen and first antibody; and
 measuring the amount of antigen-binding inhibition.
- 20 2. The method of Claim 1, wherein said second
 antibody is a purified polyclonal antibody.
3. The method of claim 1, wherein said second
 antibody is a monoclonal antibody.
- 25 4. The method of claim 1, 2 or 3, wherein said
 purified polyclonal antibody is purified by a method
 selected from the group consisting of: antigen affinity
 purification, protein A affinity purification, and
 protein G affinity purification.
- 30 5. The method of claim 1, 2, 3 or 4 wherein said
 antigen is labeled with a agent selected from the group

664001-0608109

243
AS
94

consisting of: horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, biotin and phosphorescently.

5 6. The method of claim 1, 2, 3, 4 or 5, wherein said binding surface or support is a microtiter plate well.

10 7. The method of claim 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein said test sample is serum from a mammal.

10 8. The method of claim 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein said test sample is serum from a human.

15 9. A test kit for use in an immunoassay to detect a first antibody to an antigen in a test sample, comprising:

an insoluble binding surface or support;

20 a purified second antibody which can be bound to said binding surface or support; and

purified and labeled antigen which specifically binds to and saturates said second antibody; and

25 washing, purifying, and incubating reagents.

6 2007-0 085109

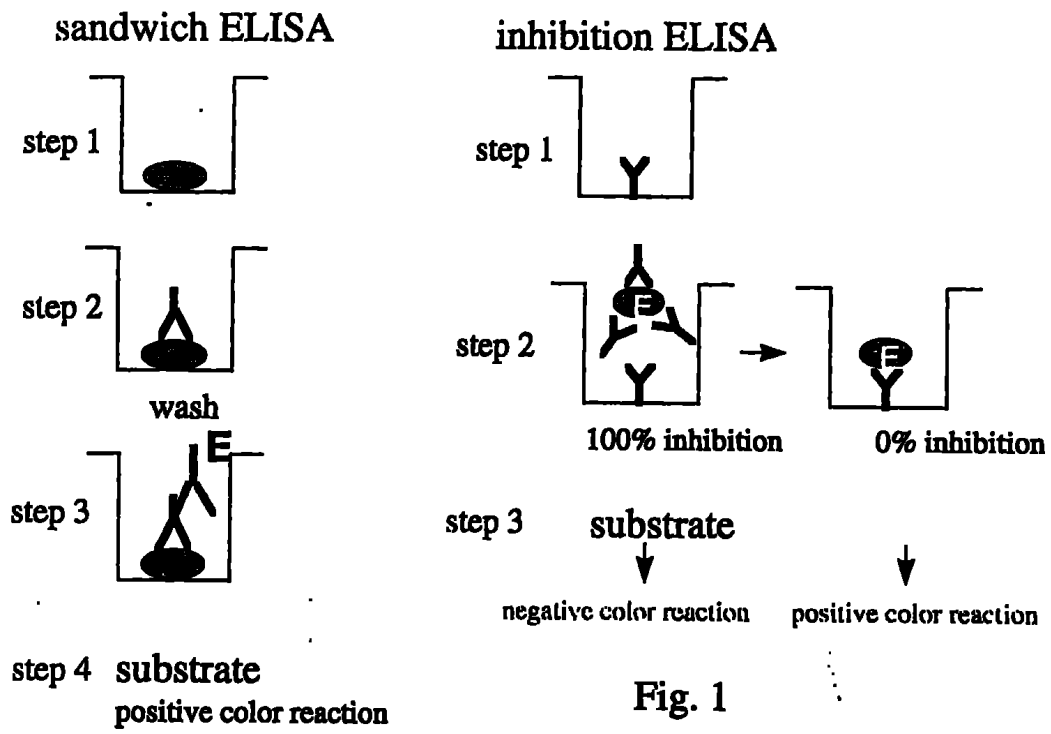


Fig. 1

144

Fig. 2

Anti-MPO Inhibition ELISA - Rhesus monkey

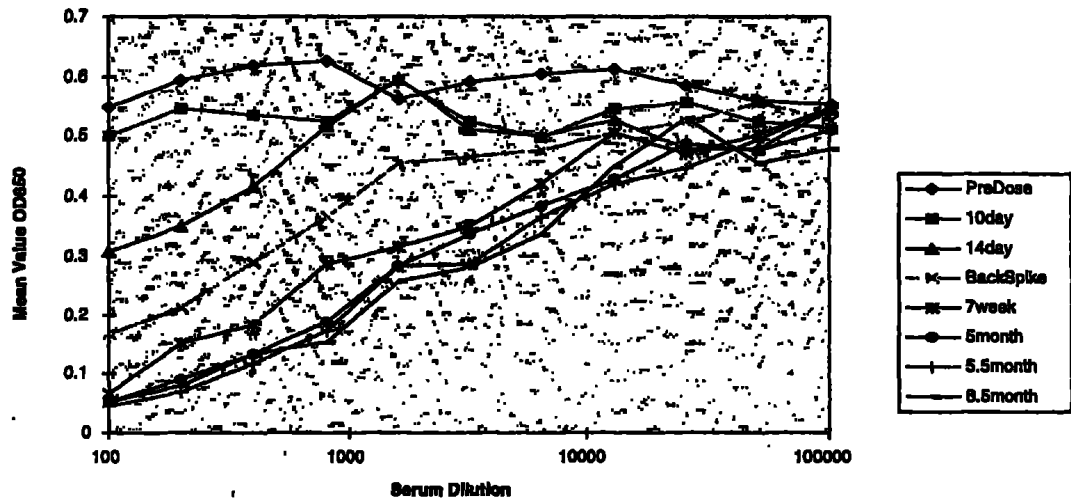
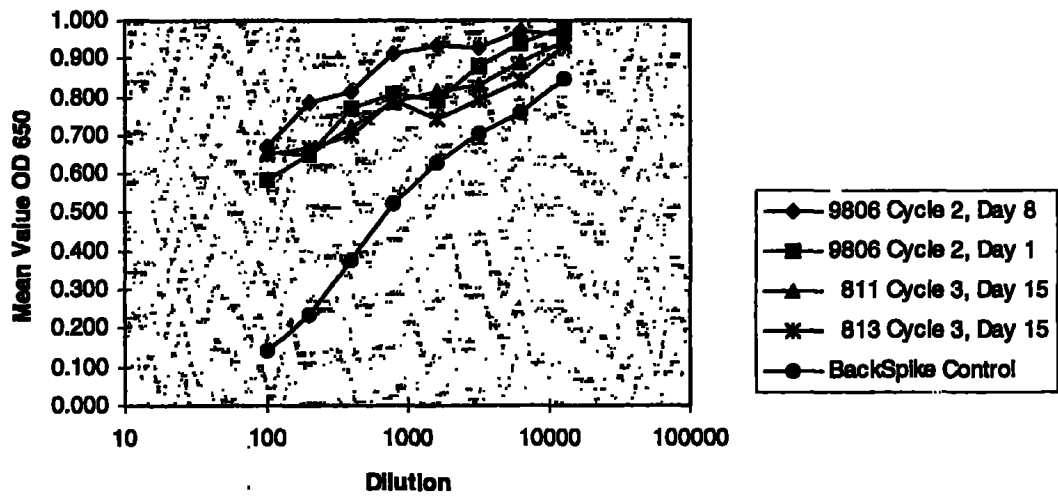
7/1
G71

Fig. 3

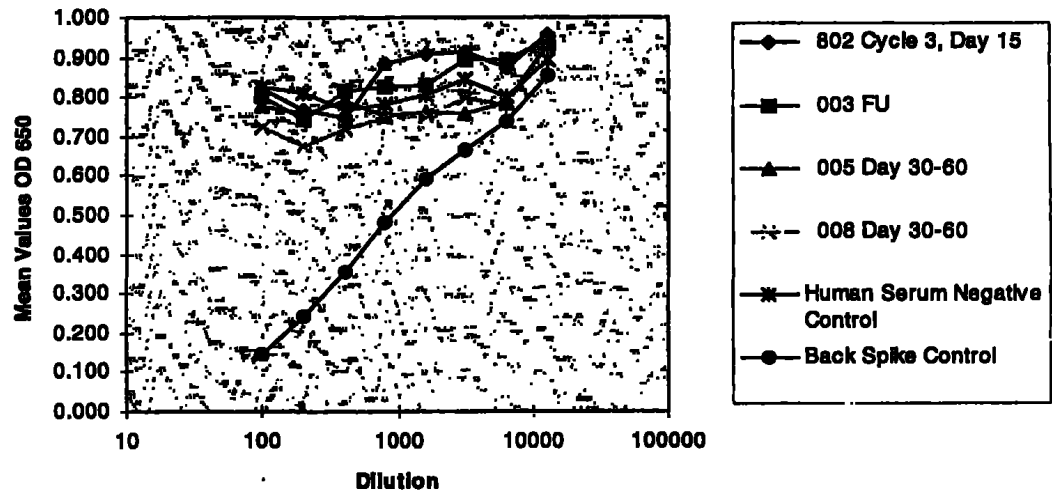
Breast Cancer Patients/docetaxel



146
9/1

Fig. 4

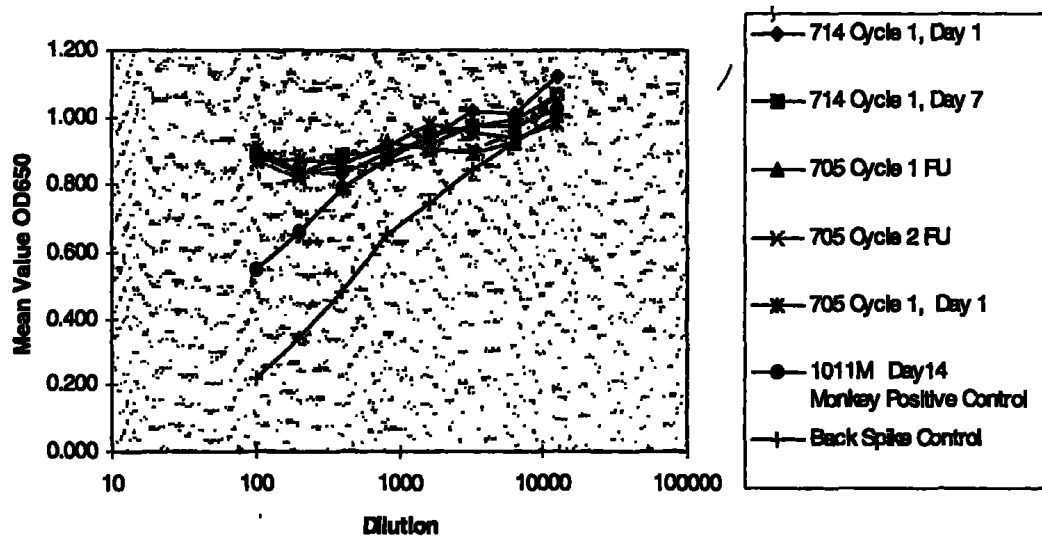
Breast Cancer Patients/docetaxel



147

Fig. 5

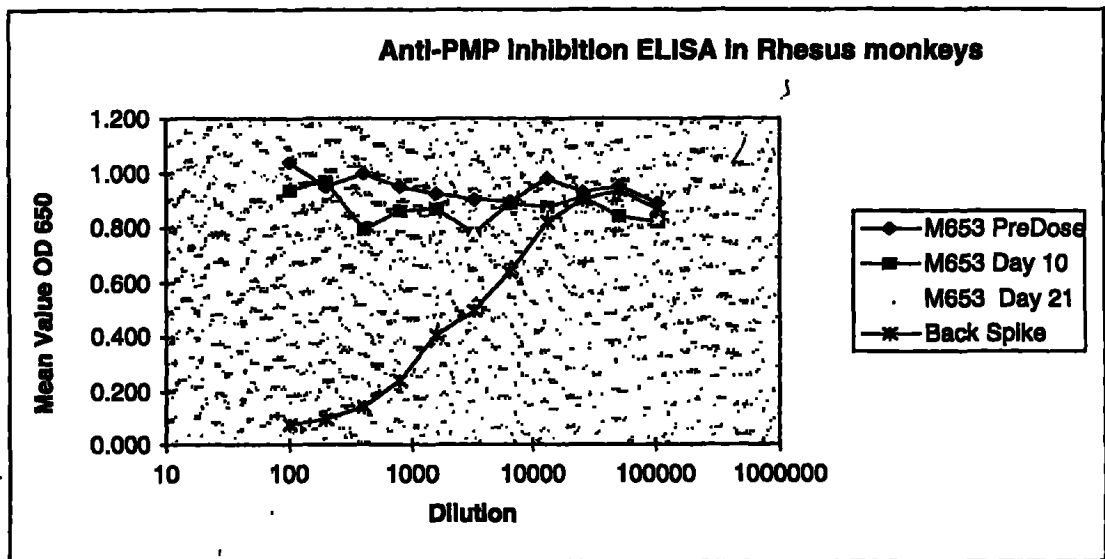
Lymphoma Cancer Patients/ASHAP



150

148

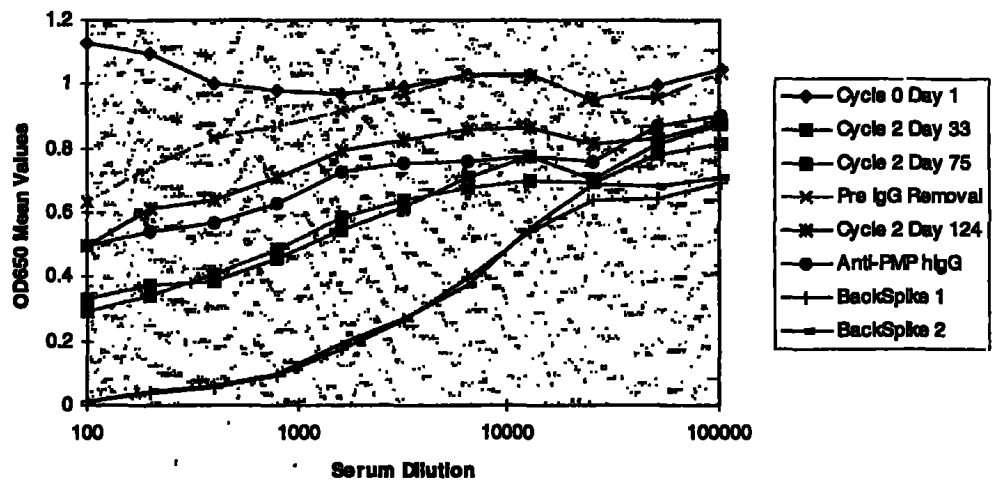
Fig. 6



AS
hdx

Fig. 7

Anti-PMP Titers, In Male Sarcoma Patient

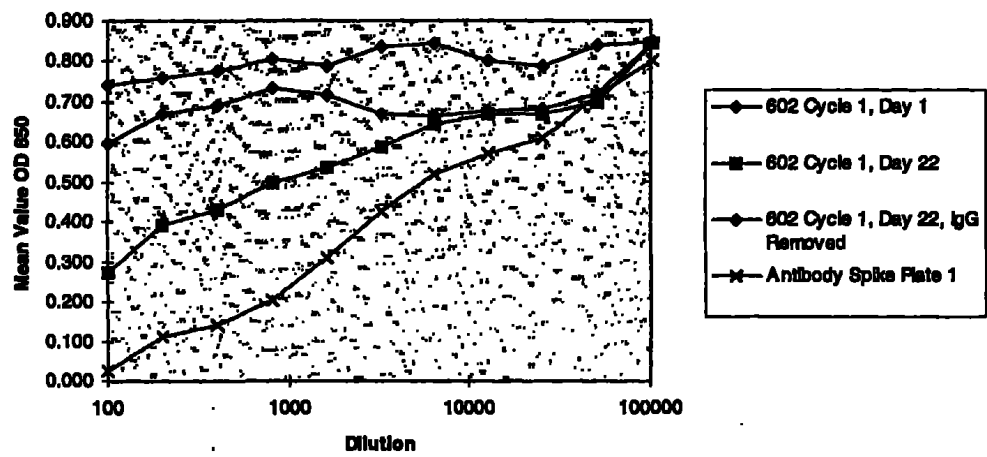


158

159

Fig. 8

Protein G IgG Removal From Patient With Positive Titer



151

151

153
155
103

**TRADUCCIÓN DEL INGLÉS AL ESPAÑOL de la Solicitud de Patente
de los Estados Unidos No. 60/158,090 relacionada con:**

**ENSAYO DE INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA DE
INHIBICIÓN (iELISA) PARA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN
DE ANTICUERPOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

**ANEXOS. La Solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No.60/
158,090 arriba mencionada, Declaración y Poder, Solicitud de Patente,
Certificación del Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados
Unidos de América; Certificación Notarial del Estado de Wisconsin,
Estados Unidos de América.**

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

**DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE
AMÉRICA**

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Octubre 18, 2000

**ESTE PARA CERTIFICAR QUE ANEXO AL PRESENTE SE
ENCUENTRA UNA FIEL COPIA TOMADA DE LOS REGISTROS
DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS
UNIDOS DE AQUELLOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE
PATENTE IDENTIFICADA ABAJO LA CUAL CUMPLE LOS
REQUISITOS PARA CONCEDERLE UNA FECHA DE
PRESENTACIÓN BAJO LA NORMA 35USC 111.**

**NUMERO DE SOLICITUD: 60/158,090
FECHA DE PRESENTACION: Octubre 07, 1999**

**Por autorización del
COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS**

**N. Woodson (Firmado)
N. WOODSON
Funcionario de Certificaciones**

SELLO ADHERIDO

EXTRACTO

154
2104
156

La presente invención es un método específico y sensible para detectar anticuerpos en muestras biológicas. Este método de ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima de inhibición (iELISA) es aplicable generalmente para la detección de anticuerpos encontrados en fluidos biológicos. El inmunoensayo ELISA de inhibición (iELISA) de la presente invención aumenta en gran proporción la sensibilidad, especificidad y conveniencia de obtener datos serológicos. La presente invención se refiere además a un estuche de prueba para uso en un inmunoensayo con el fin de detectar un anticuerpo para un antígeno en una muestra de prueba.

ENSAYO DE INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA DE INHIBICIÓN (iELISA) PARA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima de inhibición (iELISA) para detectar y cuantificar anticuerpos en muestras biológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención es un método específico y sensible para detectar anticuerpos en muestras biológicas. Este método de ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima de inhibición (iELISA) se desarrolló, en particular, para la detección de anticuerpos para polipéptidos recombinantes en suero. Este método, sin embargo, es aplicable generalmente a los demás antígenos y sus correspondientes anticuerpos encontrados en fluidos biológicos y tejidos tales como suero, lágrimas, saliva, orina, leche, semen, linfa, fluido espinal y secreciones vaginales.

Existen muchas técnicas de inmunoensayo para la inmunovigilancia de antígenos y anticuerpos (Kemeny D. M. y Challacombe S. J. *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays Theoretical and Practical Aspects*, John Wiley & Sons, 1988). Entre los de mayor sensibilidad se encuentran el ensayo ELISA directo y los ensayos de electrobandeo de proteínas. No obstante, una de las desventajas de estos procedimientos es la interferencia de fondo causada por inmunoglobulina no-inmune y otros factores de suero presentes en todos los sueros normales. Este fondo, por su tendencia a traslapar y a oscurecer bajos niveles de inmunoglobulina reactiva específica, disminuye la sensibilidad del ensayo y crea la necesidad de ensayos de confirmación suplementarios con el fin de demostrar positividad

105
3
156
157

verdadera. Un ensayo similar de confirmación empleado extensivamente es el procedimiento de bandeo de proteínas que, aunque sensible, más específico e informativo de proteínas distintas, es altamente intensivo en trabajo, difícil de interpretar y es de naturaleza cualitativa, más que cuantitativa.

Existen inmunoensayos ELISA de competencia para la detección y cuantificación de antígenos y anticuerpos en suero, que han aumentado la sensibilidad, especificidad y conveniencia de obtener datos serológicos.

EP 202 890 describe un inmunoensayo ELISA de competencia para detectar virus humano de linfoma-leucemia de células T tipo III (HTLV-III).

US 5,798,219 describe un inmunoensayo ELISA de competencia para detectar anticuerpos de enfermedades rickettsiales del ganado, ovejas y cabras.

EP 353 822 B1 revela un inmunoensayo ELISA de competencia para detectar infecciones de malaria causadas por un protozoo del género *Plasmodium*.

Sin embargo, estos métodos pueden tener también un fondo considerable, requerir grandes cantidades de antígeno purificado para recubrir la superficie de soporte, necesitar un anticuerpo etiquetado de detección secundaria y tener muchos pasos que consumen tiempo y son intensivos en trabajo.

El inmunoensayo ELISA de inhibición (*i*ELISA) de la presente invención incrementa sustancialmente la sensibilidad, especificidad y conveniencia de obtener datos serológicos. El método aumenta la sensibilidad de mediciones de anticuerpos específicos eliminando el fondo asociado con el ligamiento de inmunoglobulina no-específica. El método incrementa la especificidad incubando el anticuerpo purificado de afinidad y el antígeno etiquetado simultáneamente con el suero de ensayo. El presente método reduce el tiempo de ensayo y los requerimientos de trabajo como consecuencia de la eliminación del paso de detección secundaria.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los ensayos de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), en general, se realizan enlazando bien sea el antígeno o el anticuerpo como reactivo de referencia a un soporte de fase sólida. Seguidamente, la muestra de ensayo se hace reaccionar con el reactivo de referencia

156
158
106
4)

enlazado. Los reactivos pasan por una serie de pasos de dilución, incubación y lavado con el fin de separar reactivos enlazados y libres. El proceso concluye con un paso de detección compatible con el tipo de marcador usado, diseñado para medir indirectamente la cantidad de anticuerpo (o antígeno) en los sueros de prueba.

Un método novedoso se describe para la detección y medición de anticuerpos en fluidos biológicos tales como suero. La ventaja de este método de ensayo es que reduce o elimina positivos falsos y disminuye el tiempo de incubación del ensayo eliminando la necesidad de un paso separado de detección. Esta invención es un ensayo de inhibición, que difiere de los formatos de ensayo con ligamiento directo en que permite la inhibición de anticuerpo ligado específico, purificado de afinidad, y anticuerpo de sueros de ensayo para antígeno etiquetado. Esto evita fondos elevados causados por ligamiento no-específico de anticuerpos de detección secundaria a antígeno ligado a una fase sólida, como en el ensayo de emparejado. Una segunda ventaja de este ensayo es que permite la determinación de concentración en suero en adición a la dilución de titulación de anticuerpos. Una tercera ventaja es una reducción en el tiempo de ensayo como consecuencia de la eliminación del paso de detección secundaria.

Un aspecto de esta invención es proveer un método para la detección de anticuerpos endógenos contra polipéptidos recombinantes en suero. Esto es importante porque concentraciones crecientes de un anticuerpo específico de una proteína recombinante podrían tener un efecto neutralizador tanto sobre el fármaco como sobre la diana del fármaco. Típicamente, los niveles de anticuerpo en circulación a los fármacos en el suero son muy bajos. El método de ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima de inhibición (ELISA) de la presente invención permite una detección sensible, precisa y rápida de anticuerpos para polipéptidos recombinantes.

Este método, sin embargo, es aplicable generalmente para detectar otros antígenos y sus correspondientes anticuerpos en fluidos biológicos tales como suero. Hay muchos usos potenciales importantes para un método sencillo de detección de concentraciones de anticuerpos en sueros. Se puede analizar plasma normal de donantes normales en cuanto a concentraciones más altas de lo normal de anticuerpos endógenos de patógenos conocidos. Se podrían analizar fácilmente sueros de humanos o animales que se hayan vacunado con un virus particular, por ejemplo, el virus de la rabia, y determinar rápidamente si las titulaciones fueron suficientemente elevadas para brindar protección contra la infección. Se podrían detectar también los niveles de una clase de anticuerpos tales

como inmunoglobulina E (IgE) cuando el cuerpo está respondiendo a un alérgeno.

Otra modalidad de la presente invención es un método para determinar niveles de anticuerpos exógenos en fluidos biológicos como suero. El iELISA de la presente invención podría emplearse para determinar los parámetros de farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) de anticuerpos exógenos para evaluar la eficacia.

Otra modalidad de la presente invención es proveer un método para diagnóstico de una enfermedad detectando un antígeno o su anticuerpo correspondiente. El iELISA puede usarse para detectar un antígeno o su anticuerpo correspondiente.

Otro aspecto de la invención es el uso del ensayo en estudios epidemiológicos en zonas en donde un patógeno particular infecta una más especies endémicas de esa zona. Un estuche de ensayo iELISA en campo para detectar niveles de anticuerpos del suero sería apropiado para determinar con precisión especies particulares comprometidas y velocidades y propagación de la infección y podría constituir una herramienta importante en campañas de control.

Otro aspecto de la invención son aplicaciones multitudinarias *in vitro* para un ELISA de inhibición que podría detectar niveles de anticuerpos a partir de medios de cultivo experimentales de tejido o muestras de purificación o la detección de niveles de anticuerpo en fluidos biológicos distintos de suero, tales como orina, saliva, linfa, lágrimas, leche, semen, secreciones vaginales o fluido espinal.

Otra aplicación de este método consiste en la detección de virus, incluyendo pero no limitados a, virus humano de linfoma-leucemia de células T tipo III (HTLV-III), el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Este método es también aplicable a la detección de otros organismos patogénicos, incluyendo pero no limitados a, bacterias, levadura, hongos y parásitos. Además, este método puede usarse para detectar anticuerpos suscitados en respuesta a vacunas, incluyendo pero no limitadas a, la vacuna OspA para la prevención de la enfermedad de Lyme.

Otro aspecto de la presente invención es proveer un estuche para el análisis rápido y detección de antígenos y sus correspondientes anticuerpos en fluidos biológicos y tejidos como el suero.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra esquemáticamente un ELISA de emparejado de ligamiento directo estándar comparado con una forma del ELISA de inhibición de la presente invención.

La Figura 2 muestra titulaciones de anticuerpos provenientes de muestras de suero de monos rhesus tratados con una proteína recombinante durante un período de seis meses. Se inmunizaron monos rhesus con 100 μ g/kg de mielopoyetina (MPO), un miembro de una familia de proteínas recombinantes que son agonistas multifuncionales de interleucina-3 (IL-3) humana y receptores de factor estimulante de colonia de granulocito humano (G-CSF) (WO 95/21197 y WO 95/21256), con 0.5 mg/kg administrado subcutáneamente de Titermax (coadyuvante de Hyclone Company) el día 1 y reforzado los días 21, 42, 63, 84, 105, 126 y 147. Los controles de punta estuvieron conformados por suero de rhesus normal con adición de 4 μ g/ml anti-MPO de cabra, purificado de afinidad, que se diluye luego 1:2 para generar una curva estándar.

Las Figuras 3 y 4 muestran titulaciones de anticuerpos de suero de pacientes con cáncer de mama (agente quimioterapéutico era docetaxel, 100 mg/m² el día 1) tratadas con 5.0 μ g/kg/día de MPO. El control es suero humano normal con la adición de 4 μ g/ml de anti-MPO de cabra, purificado de afinidad, diluido como ya se indicó.

La Figura 5 muestra titulaciones de anticuerpos de suero provenientes de pacientes con cáncer de linfoma (el régimen quimioterapéutico era etopósido ESHAP, metilprednisolona, cisplatina, arabinósido de citosina, *Journal of Clinical Oncology*, 13:1734-1741, 1995) tratados con 7.5 μ g/kg/día de MPO. El control es suero humano normal con la adición de 4 μ g/ml de anti-MPO de cabra, purificado de afinidad.

La Figura 6 muestra titulaciones de anticuerpos de suero provenientes de mono rhesus femenino normal inmunizado con Promegapoyetina (PMP), un miembro de una familia de proteínas recombinantes, que son agonistas multifuncionales de IL-3 humana y receptores c-mpl humanos (WO 97/12985), 50 μ g/kg/día con inyecciones subcutáneas de 0.5 mg/kg durante 10 días.

La Figura 7 muestra titulaciones de anticuerpos de suero provenientes de un paciente masculino humano con cáncer de sarcoma, tratado con 0.5 μ g/kg/día durante 5 días por 3 ciclos con PMP. El control es suero humano normal con la adición de 4 μ g/ml de anti-PMP de cabra, purificado de afinidad.

109 159
7 261

La Figura 8 muestra el anticuerpo que se está detectando mediante la remoción de IgG por la Proteína G del suero. Las titulaciones de anti-PMP se midieron en un paciente en ciclo 1 de la quimioterapia el día 1 sin titulación de ninguna clase como control negativo y el día 22 con titulación positiva antes y después del tratamiento con Proteína G durante 1 hora a temperatura ambiente. Al suero normal se añadieron como control positivo varias concentraciones de anticuerpo de anti-PMP, purificado de afinidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención descrita es un ELISA de inhibición (iELISA). En la modalidad preferida, como se indica en Figura 1, el anticuerpo específico purificado de afinidad (anticuerpo primario) se liga a una placa de microtitulación de 96 celdillas, que se expone luego a una concentración predeterminada de antígeno etiquetado y una solución que contiene una concentración desconocida de anticuerpo de muestra de prueba (anticuerpo secundario). La placa de microtitulación que contenía la mezcla antígeno-anticuerpo se incubaba para permitirles a los anticuerpos primarios y secundarios competir por el ligamiento del antígeno etiquetado. Luego de lavar concienzudamente para remover el antígeno no ligado y el complejo anticuerpo-antígeno secundario, la medición de antígeno marcado ligado que no se removió por competencia con el anticuerpo secundario se determina por la adición de un sustrato, que genera un producto cromogénico. La cantidad de cromógeno producida se relaciona directamente con la cantidad de antígeno etiquetado ligado al anticuerpo primario y la inhibición porcentual de antígeno etiquetado por la concentración desconocida de anticuerpo secundario. La inhibición porcentual se determina por una transformación gráfica de las lecturas de absorbencia y la concentración de inhibición del 50% (IC50) de esta curva se emplea para determinar la titulación del anticuerpo secundario en la solución desconocida.

Se podría prever también un ensayo similar en el cual el antígeno se aplica sobre una placa de titulación y un anticuerpo primario etiquetado, sea monoclonal o purificado de afinidad, compite con un anticuerpo de solución de prueba desconocido por ligarse al antígeno pre-recubierto.

De igual modo se prevé que el ensayo podría llevarse a cabo en una solución separando el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario desconocido. Esto puede realizarse identificando el antígeno o antígeno primario con una marca magnética o ligándolos a agarosa y utilizando luego un campo magnético y centrifugación, respectivamente, para separarlos.

110 1/60
8 1/2

El ensayo puede efectuarse también ligando anticuerpo a superficies ligantes distintas de las placas de microtitulación. Por ejemplo, los anticuerpos podrían ligarse a pequeños chips de sensor Biacore (BR-1000-14) recubiertos con moléculas de afinidad tales como Proteína A o G o dextranos de carboximetilo. Adicionalmente, otras superficies ligantes, tales como pequeños glóbulos de agarosa o glóbulos magnéticos podrían preverse ser empleadas en el ensayo.

Existen muchos usos potenciales importantes para la simple detección de titulaciones de anticuerpos en sueros. Podría analizarse plasma normal de donantes normales para detectar titulaciones por encima de lo normal de anticuerpos de ocurrencia natural de patógenos conocidos. Se podrían probar fácilmente sueros de humanos o animales que se hayan vacunado con un virus particular, por ejemplo, el virus de la rabia, y determinar rápidamente si las titulaciones fueron lo suficientemente elevadas para brindar protección contra la infección. El ensayo podría prestarse a estudios epidemiológicos en zonas en donde un patógeno en particular infecta una o más especies endémicas en esa región. Un estuche de prueba de ELISA en campo para detectar niveles de anticuerpos de suero sería apropiado para determinar con exactitud especies particulares comprometidas y velocidades y propagación de la infección y podría constituir una herramienta importante en campañas de control.

Se podrían imaginar muchas otras aplicaciones *in vitro* para un ELISA de inhibición que pudiera detectar niveles de anticuerpos de medios experimentales de cultivo de tejidos o muestras de purificación o la detección de nivel de anticuerpo en fluidos biológicos distintos de suero, tales como orina o linfa o fluido espinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de Antisueros Policlonales

Antígenos solubles purificados se mezclan por lo general con un coadyuvante para ayudar a intensificar la respuesta inmune, estimulando varios componentes celulares del sistema inmune. Típicamente, se emplea el coadyuvante de Freund (FA, Difco Laboratories). El coadyuvante de Freund es un aceite mineral con un estabilizador para producir emulsiones estables agua-en-aceite. El Coadyuvante Completo de Freund (CFA, Difco Laboratories) contiene una dispersión de *Mycobacterium tuberculosis* seco, eliminado por calor, y causa formación de granulomas locales, que son ricos en macrófagos y células inmunocompetentes. Las inmunizaciones se llevan a cabo en forma rutinaria empleando CFA con refuerzos subsiguientes de FA en

111 161
163

intervalos de un mes. Las inoculaciones intramusculares para cabras se realizan generalmente en el músculo del muslo de la pierna trasera, seguidas por refuerzos subcutáneos para disminuir las posibilidades de una reacción anafiláctica. Se deben extraer muestras de sangre aproximadamente 10 días después de cada refuerzo hasta que se obtenga la titulación deseada. El análisis de las muestras de sangre podría efectuarse mediante ensayos de ELISA, Westerns, o precipitina de doble difusión de agarosa de Ouchterlony.

Purificación de Afinidad

Los anticuerpos se purifican rutinariamente a partir de medios de cultivo de tejidos para monoclonales, a partir de suero para policlonales, empleando métodos de cromatografía de afinidad. Un método similar emplea el uso de Proteína A aislada a partir de medios de cultivo de *Staphylococcus aureus* inmovilizado en glóbulos de sefarosa. La Proteína A tiene una afinidad extremadamente alta para la IgG y las subclases de IgG provenientes de una variedad de especies mamíferas y se ligará también a algunos anticuerpos IgA e IgM (Kronvall, G., y colegas, *J. Immunol.* 104:140-147, 1970). Para purificar anticuerpos específicos de antígeno, se acoplan ligandos de antígeno de proteína a soportes de inmunoafinidad activada vía aminos primarios. El gel, que contiene aproximadamente 5-10 mg de antígeno por ml de resina, se empaqueta en una columna y la solución que contiene el anticuerpo deseado se pasa lentamente sobre la columna, seguido por lavado, para remover proteínas no-específicas ligadas débilmente. El anticuerpo específico se eluye a continuación. La elución en ácido es el método de desorción empleado más comúnmente. Eluyentes tales como glicina-HCl pH 2.5, 20 mM HCl, citrato de sodio pH 2.5, 0.5 M ácido acético pH 2.5 se emplean rutinariamente para disociar los complejos antígeno-anticuerpo. Elución en base tal como 50 mM dietilamina pH 11.5 y elución con agentes caotróficos se usan con menos frecuencia que la elución en ácido, pero en algunos casos, son más efectivas.

Marcación con Enzimas de Anticuerpos y Antígenos

Métodos ampliamente utilizados para detectar complejos antígeno-anticuerpo de inmunoensayo comprenden el etiquetado del antígeno o del anticuerpo con un radioisótopo, una marca fluorescente, o una enzima. Preocupaciones obvias de seguridad y disposición final han aumentado la popularidad de los inmunoensayos ligados a enzima. Existen tres enzimas empleadas generalmente con los ELISAs. La que primero se empleó fue fosfatasa alcalina y la más comúnmente usada ahora es peroxidasa de rábano. La tercera es beta-galactosidasa. La fosfatasa o galactosidasa se usa en situaciones en donde puede haber

actividad de peroxidasa endógena en el antígeno. La conjugación se logra mediante una variedad de métodos. Dos de los métodos de enlazamiento cruzado más comúnmente empleados comprenden el uso de glutaraldehído (GA) (O'Sullivan, M. J. y Marks, V., *Meth. Enzymol.* 73:147, 1979) y periodato (NaIO_4) (Nakane, P. K., y Kawaoi, A., *J. Histochem. Cytochem.* 22:1084, 1974) siendo el último muy eficiente para glicoproteínas. Este método ha sido el más significativo para el desarrollo de ELISAs, debido a su alta eficiencia comparada con los métodos GA. Con el método NaIO_4 , los rendimientos son por lo menos 3 a 4 veces más altos que los conjugados preparados con GA. El método NaIO_4 se empleó originalmente para la conjugación de peroxidasa de rábano con anticuerpos, pero puede también aplicarse a otras glicoproteínas tales como varias citoquinas. Otro método más reciente de etiquetar es con biotina o avidina. Usualmente, las proteínas se marcan con biotina y la avidina se marca con fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano. Los complejos biotina-avidina tienen una alta afinidad de adhesión y pueden usarse como herramienta para aumentar en gran medida la señal de detección.

Generación de Anticuerpos

Se desarrollaron antisueros anti-MPO y anti-PMP en cabras. Se escogieron cabras como animal de selección para producción de anticuerpos, debido a que podían generarse grandes volúmenes de antisueros en un lapso de tiempo relativamente corto. Las cabras se inmunizaron con antígenos MPO y PMP en la siguiente forma. Se diluyó el antígeno a una concentración de 1.0 mg/ml de solución salina amortiguada de fosfato (PBS) pH 7.4 y seguidamente se mezcló con un volumen igual de CFA. Se aplicaron inyecciones intramusculares a los animales en el cuarto posterior trasero. Después de cuatro semanas, las cabras se reforzaron con 0.5 mg de antígeno mezclado uno a uno con FA y luego se sangraron el día diez para verificar la titulación de anticuerpos. Las titulaciones de anticuerpos se evaluaron usando técnica de difusión de agarosa doble de Ouchterlony (*Arkiv. Kemi Mineral Geol.*, 263 (14):1-9, 1948) con placas obtenidas de ICN Biomedicals, Inc., (642751). A las cabras se les administraron inyecciones de refuerzo y se sangraron cada 4 semanas.

Purificación de Afinidad de Antisueros

El anticuerpo se purificó de afinidad empleando antígeno inmovilizado en 15 mg/ml de resina AffiGel 10. El antígeno purificado se dializó en 3 ml 0.05 M amortiguador de fosfato de sodio pH 7.5, que contenía 150 mM de cloruro de sodio. Luego de la diálisis superando las 5000 veces de amortiguador de fosfato, se agregó AffiGel (1 ml/mg de proteína) a la

113
163
165

solución de antígeno y se dejó incubar de una día para otro a 4°C con rotación lenta. El bloqueo de los ésteres activos restantes se logró mediante la adición de 0.1 ml 1 M de etiléster de glicina pH 8.0 (Sigma G-8001) por ml de gel durante una o más horas a 4°C. El gel se traspasó luego a una columna y se lavó extensivamente con amortiguador de acople. Los anti-sueros de cabra se diluyeron 1:1 con PBS y se bombearon en una columna de afinidad a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. El anticuerpo purificado de afinidad se eluyó de la columna con amortiguador de elución en 0.5 M de ácido acético pH 2.5, recolectando en 1:10 volumen de amortiguador de solución salina amortiguada con fosfato 10 X para neutralizar el pH. Se hizo un ajuste final de pH a 7.0 con NaOH. Se obtuvo aproximadamente un mg de anticuerpo específico por ml de suero.

Preparación del Conjugado de Antígeno Marcado con Enzima

Los siguientes reactivos de conjugación se adquirieron de Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri: m-periodato de sodio (S-1878), borohidruro de sodio (S-9125) y peroxidasa de rábano tipo XII (P-8415). AffiGel-10, una agarosa de éster activo usada para cromatografía de afinidad, se adquirió de Bio Rad (153-6099). MPO y PMP se etiquetaron con peroxidasa de rábano (HRP) de acuerdo con el método descrito por Nakane, y colegas (*J. Histochem. Cytochem.* 22:1084-1091, 1974). Brevemente, 5.0 mg/ml de MPO purificada se dializaron en 10 mM de amortiguador de carbonato/bicarbonato pH 9.5. Se disolvió HRP en 2 ml de agua destilada a 10 mg/ml y 0.1 ml de una solución de 0.2 M periodato de sodio se añadió y se dejó agitar durante 20 minutos, a temperatura ambiente (con la adición del periodato de sodio, hay un cambio de color de marrón a verde). Luego, la solución de aldehído-HRP se dializó contra 1 mM de amortiguador de acetato de sodio, pH 4.5 a 4°C, durante 4 horas, con 5-6 cambios del amortiguador (el color cambia nuevamente a verde). El aldehído-HRP se ajustó entre pH 9-9.5 mediante la adición de 20 μ l de 0.2 M de amortiguador de carbonato pH 9.5, y 5 mg de MPO se agregaron inmediatamente a esta solución. El pH de la mezcla se volvió a verificar y se ajustó a pH 9-9.5, de ser necesario, y seguidamente se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se redujo mediante la adición de 0.05 ml de bromohidruro de sodio, 4 mg/ml, para arrojar una concentración final de alrededor de 0.18 mg NaBH_4 /ml y se dejó reposar durante dos horas a 4°C agitando ocasionalmente. La mezcla de reacción se dializó luego de un día para otro contra 2000-5000 veces su volumen de PBS a 4°C. Para almacenamiento, el conjugado antígeno/HRP se mezcló con albúmina de suero bobino (BSA, concentración final 5 mg/ml) y 0.01% de timerosal (Sigma, T-5125) como preservante.

R 114 164
166

Parámetros de Rendimiento

Para determinar las condiciones apropiadas de ensayo, se realizaron ELISAs de celosía proyectando las puntas de varias concentraciones de anticuerpo de cabra purificado de afinidad en suero humano de 5 donantes normales y dejándolo competir con una cantidad constante de anticuerpo de cabra, purificado de afinidad, absorbido de matriz sólida para los sitios de ligamiento de MPO o PMP etiquetada con HRP. En un ELISA de celosía, se diluyen concentraciones de antígeno en una dirección en una placa de microtitulación, y el anticuerpo se diluye en la otra dirección. Se seleccionan concentraciones óptimas basadas en criterios predeterminados para tiempo de desarrollo, máxima densidad óptica (OD) deseada y ruido mínimo a índice de señal. Los resultados se graficaron como la concentración de anticuerpo de competencia vs. OD₂₈₀ ó como dilución vs. OD₂₈₀. Se determinó que una concentración de anticuerpo recubierto de 0.25 μ g/ml era lo suficientemente limitante para permitir competencia adecuada de 10 ng/ml de HRP-MPO. La dilución inicial de suero de paciente humano se diluyó 1:100 para eliminar cualquier efecto de matriz de suero y luego se diluyó en serie a 1:102,400. Óptimamente, la combinación deseada de anticuerpo de recubrimiento, anticuerpo de suero y MPO o PMP conjugada con HRP produciría una densidad óptica de 0.5-1.0 a 650nm en aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente para el límite superior de la curva estándar.

Ensayo de Inmunoabsorbente Ligado a Enzima de Inhibición (iELISA)

Albúmina de suero bobino (BSA, grado RIA, fracción V), usada en amortiguadores de ensayo, se adquirió de Sigma (A-7888). Para el ELISA, se emplearon Immulon II, placas de microtitulación de poliestireno de 96 celdillas (Dynatech) y sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (50-76-04). Se compró Tween 20 de Sigma (P-1379). Se pre-recubrieron placas de poliestireno de 96 celdillas con 150 μ l/celdilla de 0.25 mg/ml de una solución de anticuerpo PMP o anti-MPO de cabra, purificada de afinidad, diluida en 0.1 M de amortiguador de carbonato de sodio pH 8.2, y se dejó ligar de un día para otro a temperatura ambiente, humedad 100%. Seguidamente se vaciaron las placas para retirar el anticuerpo no ligado y se bloquearon con la adición de 200 μ l/celdilla de BSA-10 3% mM de solución salina amortiguada de fosfato-0.05% Tween 20 pH 7.4, durante una hora a 37°C, y 100% de humedad. El agente bloqueador no ligado se retiró luego y las placas se lavaron tres veces con 0.05% Tween-solución salina isotónica (TS). A continuación, 75 μ l/celdilla de suero humano diluido 1:50 (1:100 final) se añadió a las celdillas apropiadas diluido en 0.1% BSA-10mM PBS-0.05% Tween 20. Luego se agregaron 75 μ l de

115 165
* 16

HRP/antígeno a 1:50,000 (1:100,000 final) a cada celdilla y el suero recubierto y el anticuerpo tuvieron que competir por HRP/MPO durante 2 horas a 37°C y 100% de humedad. A renglón seguido se vacían las placas para remover conjugado no ligado y se lavan tres veces con TS. En el próximo paso, se llevó a cabo una reacción colorimétrica para determinar la actividad de peroxidasa ligada mediante la adición de 150 μ l/celdilla de solución de sustrato de peroxidasa TMB a cada celdilla y dejando avanzar la reacción durante aproximadamente 15 minutos. Finalmente, se midió la absorbencia del color azul resultante por medio de un autolector ELISA (Dynatech, Estados Unidos de América) a 650 nm.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Medición de Anticuerpos de MPO en Monos Rhesus

La familia mielopoyetina (MPO) de proteínas son agonistas multifuncionales de IL-3 humana y complejos de receptor G-CSF y se desarrollaron para producir una atenuación significativa en neutropenia y trombocitopenia en pacientes que recibían terapia de cáncer mielosupresor. Es crítico, cuando se administra terapia de proteínas, determinar si se están generando anticuerpos que puedan tener significancia clínica importante tal como neutralización. El ensayo *ELISA* tenía que determinar las titulaciones de anticuerpo de suero de un mono rhesus inmunizado y reforzado durante un período de 6.5 meses con MPO. La inmunización estuvo conformada por inyecciones subcutáneas de 100 μ g/kg de MPO con 0.5 mg/kg de Titermax (coadyuvante) con refuerzo subsiguiente de 100 μ g/kg los días 21, 42, 63, 84, 105, 126 y 147. El suero se obtuvo y luego se adicionó al ensayo en una dilución 1:100 y entonces se diluyó en serie 1:2 para 10 diluciones con el fin de determinar las titulaciones. Los resultados sugieren que las titulaciones aparecen primero alrededor del día 14 y alcanzan un pico entre 2.5 y 5 meses. Para un control positivo, se agregó anti-MPO de cabra, purificada de afinidad, a suero de rhesus normal a 4 μ g/ml y a continuación se diluyó en serie 1:2 (Figura 2).

Ejemplo 2 Medición de Anticuerpos de MPO en Pacientes con Cáncer

Se analizó suero de pacientes con cáncer tratados con MPO para determinar si estaban produciendo anticuerpos para MPO. A pacientes con cáncer de mama se les administraron 5.0 μ g/kg/día de MPO después de varios ciclos de tratamiento quimioterapéutico de docetaxel y a pacientes de linfoma se les dieron 7.5 μ g/kg/día de MPO después de recibir régimen quimioterapéutico ESHAP. Los resultados de pacientes con cáncer y linfoma tratados con MPO o no mostraron anticuerpos anti-

MPO o mostraron titulaciones leves de menos de 1:500 usando un cálculo IC50 (Figuras 3-5).

Ejemplo 3 Medición de Anticuerpos de PMP en Monos Rhesus

Se empleó iELISA para determinar titulaciones de anticuerpos en otra clase de factores de crecimiento hematopoyético. Promegapoyetina (PMP), un agonista de receptor dual para la IL-3 y receptores de trombopoyetina (TPO), ha demostrado una recuperación mejorada de trombocitopenia inducida por quimioterapia. Se examinó el suero de monos rhesus normales inmunizados con PMP por vía subcutánea durante 10 días con 50 μ g/kg/día. Una titulación fue detectable por primera vez el día 21 (Figura 6).

Ejemplo 4 Medición de Anticuerpos de PMP en Pacientes con Cáncer

Se analizó para detectar anticuerpos el suero de un paciente masculino con sarcoma tratado con 3 ciclos de 0.5 μ g/kg/día de PMP durante 5 días. Con el iELISA, se detectó una titulación creciente de anticuerpos para PMP con ciclos de tratamiento subsiguientes (Figura 7). Con concentraciones en aumento de anticuerpo específico PMP un efecto neutralizador sobre el fármaco y el factor de crecimiento endógeno podría tener como resultado la inducción de trombocitopenia.

Ejemplo 5 Demostración que el iELISA estaba midiendo Anticuerpo en el Suero

Para demostrar que el iELISA estaba midiendo ciertamente anticuerpo en el suero del paciente, el suero de titulación positiva se trató previamente con 50 μ g/ml de Proteína G durante 1 hora para remover cualquier IgG del suero y, a continuación, se ensayaron muestras antes y después del tratamiento de Proteína G. Los resultados muestran claramente que después de la adición de Proteína G, los niveles de anticuerpo del suero regresan a los niveles de línea base del suero del pre-tratamiento (Figura 8).

Todas las referencias, patentes o solicitudes citadas aquí se incorporan por referencia en su integridad como si estuvieran escritas aquí.

Varios otros ejemplos serán aparentes para la persona con habilidades en el arte después de leer la presente revelación, sin apartarse del espíritu y la órbita de la invención. Se pretende que todos los demás ejemplos se incluyan dentro de la órbita de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método para la detección de un primer anticuerpo en una muestra de prueba, que comprende los pasos de:
 - recubrir una superficie de enlazamiento o soporte con un segundo anticuerpo purificado para formar una superficie revestida con anticuerpo;
 - combinar una cantidad predeterminada de un antígeno etiquetado purificado y dicha muestra de prueba que contiene dicho primer anticuerpo;
 - agregar la mezcla incubada de antígeno y primer anticuerpo a dicha superficie revestida con anticuerpo;
 - incubar dicha superficie recubierta con anticuerpo con dicha combinación de antígeno y primer anticuerpo; y
 - medir la cantidad de inhibición enlazante de antígeno.
2. El método de la reivindicación 1 en donde dicho primer anticuerpo es un anticuerpo policlonal purificado.
3. El método de la reivindicación 2 en donde dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. El método de la reivindicación 1, 2 o 3 en donde dicho anticuerpo policlonal purificado se purifica mediante un método seleccionado a partir del grupo que consiste de: purificación de afinidad de antígeno, purificación de afinidad de proteína A y purificación de afinidad de proteína G.
5. El método de la reivindicación 1, 2, 3 o 4 en donde dicho antígeno se etiqueta con un agente seleccionado a partir del grupo que consiste de peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, biotín y fosforecentemente.
6. El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, o 5 en donde dicha superficie enlazante o soporte es una celdilla de placa de microtitulación.
7. El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, o 6, en donde dicha muestra de prueba es un suero de un mamífero.
8. El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7, en donde dicha muestra de prueba es un suero de un humano.

168
120
118

9. Un estuche de prueba para uso en un inmunoensayo con el fin de detectar un primer anticuerpo para un antígeno en una muestra de prueba que comprende:

- una superficie de enlazamiento insoluble o soporte;
- un segundo anticuerpo purificado ligado a dicha superficie de enlazamiento o soporte; y
- un antígeno purificado y etiquetado que específicamente se enlaza y satura dicho segundo anticuerpo.

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DEL DOCUMENTO ANEXO
TERMINADA ESTE 29 DE DICIEMBRE, 2000.