

AS: 83.339

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA
Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREAC.



00 76267

SOLICITUD DE
ENTE DE
/ENCION

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 00076267 00000000

Folios: 114

Fecha (AÑO): 2000-10-06 16:59:36

Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

PHARMACIA CORPORATION

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Estados Unidos de América

Departamento o Estado

Illinois

Ciudad

Chicago

Dirección

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

RAMIRO CASTRO DUQUE

Dirección

Cra 7 No. 16-56 Piso 9

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Mark A. Abrams

Dirección y Domicilio

St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América

Identificación

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención ENSAYO DE INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA DE INHIBICION

(ELISA) PARA DETECCION Y CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS EN

MUESTRAS BIOLOGICAS

PRIORIDAD REIVINDICADA
BAJO EL CONVENIO DE PARISSI ☒NO ☐

(33) País US

(32) Fecha 99-10-07

(31) No. Solicitud 60/158,090

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

G 01 N 33/541

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

2

[Handwritten mark]

Suministrar un método específico y sensible para detectar anticuerpos en
muestras biológicas. Este método de ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima
de inhibición (ELISA) es aplicable generalmente para la detección de anticuerpos
encontrados en fluidos biológicos.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|---|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☐ |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C | ☐ |
| Recibo de la tasa respectiva \$608.000 (Recibo No.59,966) | ☒ |
| Si se reivindica prioridad, el certificado respectivo (copia legalizada) | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios Informales | ☒ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietarios según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☐ |
| Extracto para resumen o para publicación según formato | ☐ |
| Arte final 12 x 12 cms | ☐ |

**SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES
 NUEVA Y DE MI PROPIEDAD**

[Handwritten signature]
FIRMA DEL APODERADO

Octubre 06, 2000
 CPB/hsr.
 CC.170.322 de Bta TP.No.1003 del C.S.J.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: 00076267 00000000 Folios: 114
 Fecha (UNB): 2000-10-06 16:59:36
 Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRA/ 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT: 999171030-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 59,962
 FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2000

***** CONSIDERACION *****

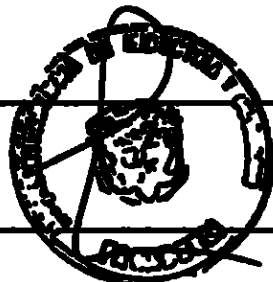
DESCRIPTIVO	TIPO PAGO	PAÍSO	SECCIONAL	CUENTA	Nº. PAGO	V. PAG.
BOICARD I CASTRO LTRA	CONSIDERACION	PAGO POPULAR	BOICOTA	000-00114-3	7700210	13,740,000.00
BOICARD I CASTRO LTRA	CONSIDERACION	PAGO POPULAR	BOICOTA	000-00113-2	7700210	16,990.00
BOICARD I CASTRO LTRA	CONSIDERACION	PAGO POPULAR	BOICOTA	000-00114-1	7700210	15,070.400.00

***** CONCEPTOS *****

CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 PAGO 91-01 SERVICIOS	100.000.00
TRANSFERENCIA DE VAL. DE PATENTE DE 1º	100.000.00
TOTAL :	200.000.00

CONCEPTOS DE VAL. DE PATENTE DE 1º

Representante: _____
 Firmado por: _____
 FIRMADO POR CAJA APLICADA AL EXERCICIO DE:



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
 Conmutador: 334 12 21
 Fax: 281 31 25
 e-mail: info@sic.gov.co
 Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

Se retiró folio 4 de la paja
de propietarios
WZab

1
f
4

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

La presente solicitud reivindica prioridad bajo el Título 35, Código de los Estados Unidos, § 119 de la solicitud Provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/158090 presentada el 07 de octubre de 1999.

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.

16
5

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 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 (iELISA) 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.

87

SUMARIO 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 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 emparedado. 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 (iELISA) 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

709

podrían detectar también los niveles de una clase de anticuerpos tales como inmunoglobulina E (IgE) cuando el cuerpo está respondiendo a un alérgeno.

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

Otra incorporación de la presente invención es proveer un método para diagnóstico de una enfermedad detectando un antígeno o su anticuerpo correspondiente. El *ELISA* 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 o más especies endémicas de esa zona. Un estuche de ensayo *ELISA* 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.

H
10

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.

Definiciones

La siguiente es una lista de abreviaturas y los correspondientes significados usados aquí en forma intercambiable:

22
11

Mab	anticuerpo monoclonal
C	constante
C_H	región C de cadena pesada
C_L	región C de cadena liviana
ScFv	molécula Fv de cadena simple
V	variable
V_H	región V de cadena pesada
V_L	región V de cadena liviana
Fab	ligamiento de antígeno de fragmento (V _H , C _H , V _L , C _L)
Fv	variable de fragmento (V _H , V _L)
g	gramo(s)
mg	miligramo(s)
ml ó mL	mililitro(s)
RT	temperatura ambiente
PEG	poli(etilen)glicol

La siguiente es una lista de definiciones de varios términos usados aquí:

El término “anticuerpo”, como se emplea aquí, incluye diferentes formas de anticuerpos modificados o alterados (fabricados) tales como: una inmunoglobulina intacta; un fragmento Fv que contiene únicamente las regiones variables de cadena pesada y liviana (V_H, y V_L); un fragmento Fv unido por un enlace disulfuro (Brinkmann, y colegas, Proc. Natl. Acad. Sci.

13
12

USA, 90:547-551 (1993)); un fragmento Fab que contiene regiones variables y partes de regiones constantes, (Fab)'₂, Fabs diméricos o Fabs triméricos, que pueden ser multivalentes y/o multiespecíficos; un anticuerpo de cadena simple (ScFv) (Bird, y colegas, Science 242:424-426 (1988); Houston, y colegas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988)), multímeros de cadena simple (grupos de dos cuerpos, tres cuerpos, cuatro cuerpos, etc.), que pueden ser multivalentes y/o multiespecíficos. El anticuerpo puede ser de origen animal (especialmente ratón o rata) o humano o puede ser quimérico (Morrison, y colegas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)) o humanizado (Jones, y colegas, Nature 321: 522-525 (1986), y la solicitud de patente del Reino Unido publicada #8707252). Estas diferentes formas de anticuerpos se ilustran esquemáticamente en Figura 9. Tal como se emplea aquí, el término anticuerpo incluye también anticuerpos enteros o fragmentos, que se han fusionado a radioisótopos, fármacos, toxinas, enzimas y superficies de biosensor. El término "anticuerpo", como se emplea aquí, incluye más aún anticuerpos enteros o fragmentos, que se han modificado mediante la adición de una molécula de PEG.

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a inmunoglobulinas híbridas en las cuales las regiones variables murinas se preservan y las regiones constantes son cambiadas por las de un anticuerpo humano.

14
13

El término "anticuerpos humanizados" se refiere a inmunoglobulinas híbridas en las cuales los residuos murinos que se conforman a regiones determinantes de complementariedad específica y otras de posible relevancia estructural se trasplantan a una estructura de anticuerpo humano.

El término "plantas transgénicas" se refiere a plantas modificadas genéticamente para producir en forma constitutiva anticuerpos funcionales o sus fragmentos.

El término "planticuerpos", como se emplea aquí, se refiere a Mabs producidos en plantas.

Tal como se emplea aquí, el término "MPO" o "mielopoyetina" se define como una familia de agonistas de receptor multifuncionales que comprende una variante IL-3 y un agonista de receptor G-CSF como se enseña en la Patente de los Estados Unidos No. 6,057,133, 6,030,812 y 5,738, 849.

Tal como se emplea aquí, el término "PMP" o "Promegapoyetina" se define como una familia de agonistas de receptor multifuncionales que comprende un ligando c-mpl permutado circularmente y un agonista de receptor G-CSF, como se enseña en la Patente de los Estados Unidos No. 6,066, 318 y WO97/12985.

14

Tal como se emplea aquí, el término "ProGP" o "Progenipoyetina" se define como una familia de agonistas de receptor multifuncional que comprende un ligando flt3 permutado circularmente como se enseña en WO 98/17810.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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 µg/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 4µg/ml anti-MPO de cabra, purificado de afinidad, que se diluye luego 1:2 para generar una curva estándar.

16/15

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 µg/kg/día de MPO. El control es suero humano normal con la adición de 4µg/ml de anti-MPO de cabra, purificado de afinidad, diluido como ya se indicó.

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 µg/kg/día de MPO. El control es suero humano normal con la adición de 4 µg/ml de anti-MPO de cabra, purificado de afinidad.

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 µg/kg/día con inyecciones subcutáneas de 0.5 mg/kg durante 10 días.

Figura 7 muestra titulaciones de anticuerpos de suero provenientes de un paciente masculino humano con cáncer de sarcoma, tratado con 0.5 µg/kg/día durante 5 días por 3 ciclos con PMP. El control es suero humano

12/16

normal con la adición de 4 $\mu\text{g/ml}$ de anti-PMP de cabra, purificado de afinidad.

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.

Figura 9 muestra representaciones esquemáticas de los formatos de fragmento Mab fabricados, descritos aquí. (a) IgG intacta (bivalente), (b) fragmentos de inmunoglobulina monovalente (Fab, Fv y scFv), (c) multicuerpos (bivalentes, biespecíficos, trivalentes y triespecíficos). Dominios variables (V) y dominios constantes (C) se representan por óvalos (dominios V_H están sombreados en gris, dominios V_L son negros y dominios C son blancos) y los enlazadores se representan como líneas negras, (d) secuencias quiméricas, humanas, se representan por zonas punteadas y secuencias de ratón por líneas cruzadas, (e) Fab dimérico (Fab). Para cada estructura sólo se muestra un arreglo de dominio V; obviamente hay orientaciones alternativas de dominios V y enlazadores.

17

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención descrita es un ELISA de inhibición (iELISA). En la incorporación 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 determinada 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.

4/18

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.

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.

Se podría prever el uso de anticuerpos fabricados para el paso de captura en un ELISA o para la detección de anticuerpos exógenos terapéuticos, fabricados de fluidos biológicos, muestras de purificación o medios de cultivo de tejidos. Esto podría incluir: Mabs de ratón tales como OKT3; scFvs tales como D2E7 (adalimumab) y CAT152, anticuerpos quiméricos tales como Rituxan (Rituximab), ReoPro (Abciximab), Remicade (Infliximab) y Simulect (Basiliximab); anticuerpos humanizados tales como Herceptin (Trastuzumab), Zenapax (Dacriximab) y Synagis (Palivizumab); fragmentos Fab; y anticuerpos pegilados como CDP-870.

El uso de anticuerpos exógenos para "terapia de anticuerpos" se inició con la aprobación por la FDA en 1986 del Orthoclone OKT3 (Muromomab) Mab de ratón anti-CD3 para terapia renal aguda (Shield, C. F., y colegas, *Am. J. Kidney Dis.* 27:855-864 (1996). Sin embargo, cuando se emplearon terapéuticamente Mabs de roedores, se desarrolló una respuesta de anticuerpo antimurino humano que resultó en una rápida y fuerte sensibilización que neutralizó completamente la eficacia terapéutica del anticuerpo monoclonal. Desde entonces, para superar este problema, se han desarrollado un número de enfoques para fabricar anticuerpos (para una revisión véase Gavilondo, J. V., y colegas, *Biotechniques*, 29:128-145, 2000). Un enfoque para fabricar anticuerpos es "anticuerpos quiméricos". Un número de anticuerpos quiméricos han sido aprobados en los Estados Unidos o Europa para el tratamiento de enfermedades tales como: (Rituximab), que se dirige como diana contra CD20 para el tratamiento de linfoma Non-Hodgkin (para una revisión véase Grillo-López, A. J., y colegas, *Semin. Oncol.* 26 (5, suplemento 14):66-73, 1999; Maloney, D. G. *Semin. Oncol.* 26 (5, suplemento 14):74-78, 1999); ReoPro (Abciximab), que liga IIb/IIIa en plaquetas para el tratamiento de complicaciones isquémicas cardíacas en pacientes PTCA de alto riesgo; Remicade (Infliximab) que liga TNF- α para tratamiento de la enfermedad de Crohn y artritis reumatoide (Markman, A., y colegas, *Drugs* 59(6):1341-1359, 2000); y Simulect (Basiliximab), que liga una subunidad IL-2 α para rechazo de trasplante de riñón. Otro enfoque para fabricar anticuerpos es

“anticuerpos humanizados”. Un número de anticuerpos humanizados han sido aprobados en los Estados Unidos o Europa para el tratamiento de enfermedades incluyendo; Herceptin (Trastuzumab), que liga el dominio extracelular de receptor Her2/Neu para el tratamiento de cáncer de mama metastático (para una revisión, véase Albanell, J., y colegas, *Drugs Today* 35(12) 931-946, 1999); Zenapax (Daclicximab), que liga una subunidad IL-2 α para rechazo de trasplante de riñón (90% humano, 10% murino); Synagis (Palivizumab), que liga el sitio antigénico A de la proteína F de virus sincitial respiratorio (RSV) para el tratamiento de infecciones RSV (95% humano, 5% murino). Un enfoque diferente es producir el Mab en un ratón “humanizado” en el cual la expresión de Abs de ratón se suprime y reemplaza con genes de anticuerpos humanos. Varios anticuerpos completamente humanos producidos en “humanizados” se encuentran bajo desarrollo incluyendo: ABX-IL8, que liga IL-8 y está desarrollándose para el tratamiento de artritis reumatoide y psoriasis; y MDX CD4, que se dirige como diana a CD4 para el tratamiento de artritis reumatoide. Hay varios productos en desarrollo que utilizan anticuerpos de cadena simple incluyendo: D2E7 (adalimumab), que liga TNF α para el tratamiento de artritis reumatoide (para una revisión, véase Chantry, D., *Curr. Opin. Anti-inflammatory Immunomodulatory Invest. Drugs* 2(1):31-34, 2000); y CAT 152, que liga TGF β 2 para la prevención de cicatrización luego de una cirugía de glaucoma. También se han “pegilado” Mabs para aumentar la vida media. Un ejemplo similar de un Mab “pegilado” es CDP-870 que es un Fab simple PEGilado contra TNF α con dos moléculas PEG 20K ligadas

a una cisterna en la región articulada para el tratamiento de artritis reumatoide.

Además del uso de Mabs para el tratamiento de enfermedades se han aprobado numerosos Mabs en los Estados Unidos o Europa con fines de diagnóstico incluyendo: Indimacis 125 (Igovomab), que es un (Fab)'2 murino para diagnóstico de adenocarcinoma ovárico; CEA-Scan (Arcitumomab), que es un Fab murino para la detección de cáncer colorrectal metastático/recurrente; ProstaScint (Capromab-Pentetato), que es un Mab murino para detectar adenocarcinoma de próstata; Tecnemab KI, que es una mezcla Fab/(Fab)'2 para el diagnóstico de lesiones de melanoma cutáneo; Veluma (Nofetumomab) que es un Fab murino para detectar cáncer de pulmón de células pequeñas; y Humaspect (Votumumab), que es un Mab humano para la detección de carcinoma del colon y el recto. Una incorporación de la presente invención es el uso del método ELISA con fines de diagnóstico para detectar antígenos o anticuerpos asociados con una variedad de enfermedades. Uno de estos ejemplos lo constituye la detección de anticuerpos asociados con linfomas de células B. Alrededor del 80% de las malignidades linfoproliferativas adultas comprenden tumores que contienen Ig o que producen Ig. Estos tumores, llamados tumores de células B, incluyen aquellos asociados con leucemias y linfomas tales como leucemia linfocítica crónica, leucemia de células de linfoma, linfoma nodular, linfoma de células grandes, linfoma de Burkitt, leucemia de células pilosas, linfoma "indiferenciado" y linfoma

linfocítico agudo de tipo de células pre-B. Las poblaciones de células tumorales de estos cánceres son clonales por naturaleza y parecen contener células suspendidas en varias etapas de diferenciación con respecto a la síntesis y secreción de Ig. Debido a que la población tumoral es monoclonal, la Ig producida por la población es igualmente monoclonal. Es decir, la Ig que se expresa o segrega se restringe a una sola región V_H y V_L y a una sola cadena liviana del tipo κ o λ . Usualmente es de la clase IgM (cadena pesada μ). Otro ejemplo lo constituye la detección de niveles de IgE para determinar si un paciente está respondiendo a un alérgeno. Cuando un paciente se sensibiliza con un alérgeno, los síntomas, flujo nasal, estornudo, congestión, tos, ojos irritados, dolor de cabeza, erupción cutánea, son difíciles de distinguir de los de un resfriado, catarro, una infección bacterial. Al estar en capacidad de medir rápidamente los niveles de IgE, que se incrementan por la sensibilización con un alérgeno, un médico podría fácilmente determinar si el paciente estaba sufriendo de una alergia y estar en capacidad de tratar al paciente en consecuencia. En esta forma del iELISA el 'antígeno' es un anticuerpo anti-IgE.

Mabs adicionales que se hallan actualmente en desarrollo se resumen en la Tabla 1 (Gavilondo, J. V., y colegas, *Biotechniques* 29:128-145). El método de la presente invención podría emplearse además para detectar los anticuerpos listados en la Tabla 1, pero no se limita a dichos anticuerpos.

24

Tabla 1¹

Anticuerpos representativos en Evaluación Clínica

Institución/Compañía	Anticuerpos	Características/Aplicación (en orden)
CÁNCER		
Islys/Scripps Coulter Pharm. Inc.	Vitaxin™ Anti-BI	MAB contra $\alpha v \beta 3$ integrin. Cánceres. Antígeno anti-BI de Mab de ratón, acoplado a linfoma de células ¹³¹ IB.
NCI/NIH, Bethesda	Anti-Tac Fv-PE38, LMB-7, receptor anti-transferrina, Ch14.18	1. Receptor anti-Tac de fragmento scFv, acoplado genéticamente a dominios de toxina de <i>Pseudomonas</i> (PE38). Leucemia/linfoma. 2. Fragmento scFv contra una glicoproteína asociada a un tumor, acoplado genéticamente a dominios de toxina de <i>Pseudomonas</i> (PE38). Cánceres del colon y la mama, otros tumores sólidos de etapa avanzada. 3. Tumores sólidos refractorios avanzados. 4. Anticuerpo anti-melanoma quimérico. Melanoma y neuroblastoma.
NeoRx/Dupont	Verhuma™	Mab para crear imágenes en tumores de pulmón de células pequeñas y células no pequeñas.
Janssen Pharmaceutica/NeoRX NeoRx	Avicidin NR-LU-10	Conjugado de Mab. Cánceres colorrectales, de pulmón, de próstata. Raditerapia in situ con anticuerpo de carcinoma pan etiquetado indirectamente ⁹⁰ Y. Metástasis del colon, cáncer ovárico, cáncer de próstata.
PerImmune	Cáncer anti-colon	Mab humano. Creación de imágenes de cáncer colorrectal.
Genentech Chiron	Anti-VEGF Anticuerpo biospecífico.	Anticuerpo humanizado. Cánceres. Cáncer.
Wyeth-Ayerst Labs	CMB-401, CMA- 676	1. Cáncer ovárico. 2. Leucemia mielógena aguda recurrente.
Memorial Sloan- Kettering, NY	HB72.3	Ab B72.3 humanizado contra glicoproteína asociada a tumor TAG72. Cáncer de mama.
Centocor/Glaxo	Panorex™ edrecolomab	Ab anti <i>Lewis</i> y Ab quimérico 17-1. Terapia de coadyuvante para cáncer colorrectal metastático.
Cytel/Upjohn	CY1748	Selectin Ab anti-P humanizado. Inflamación y cáncer.
Royal Free Hospital Sch. Medicine, Londres	MFE-23	Fragmento scFv contra el dominio CEA B3 obtenido de una biblioteca de fagos. Creación de radioimágenes en carcinoma de colon.
Contra Costa Cancer Center, California	HuBrE.3	Anti mucin Ab humanizado etiquetado indirectamente ⁹⁰ Y. Radioterapia in situ en cáncer de mama.

¹ Gavilondo, J. V., y colegas, *Biotechniques* 29: 128-145.

25

ImClone Systems	C225, BEC-2	1. Ab anti EGF-receptor quimérico. Muchos cánceres positivos EGF-receptor. 2. MAb anti-idiotípico que imita el gangliósido GD3 encontrado en algunas células tumorales. Cáncer de células pequeñas.
CIMAB SA, Havana/York Medical	Ior-R3, ior-r3hum, ioc-c5	1. MAb anti EGF-receptor. Cánceres positivos de EGF receptor en combinación con radioterapia. 2. Anticuerpo de anti EGF-receptor humanizado. Cánceres positivos de EGF receptor. 3. MAb de ratón etiquetado 99Tc contra glicoproteína asociada a carcinoma. Creación de imágenes de carcinoma colorrectal metastático y recurrente.
ImmunoGen	Oncolysin B™, C242-DM1	1. Immunotoxina compuesta por un MAb contra células de linfoma, acoplada a un fármaco patentado muy potente. 2. MAb contra un antígeno de cáncer de colon, acoplado a un fármaco patentado muy potente.
Bristol-Myers Squibb	BR96	Conjugado entre un MAb mejorado genéticamente fabricado contra el antígeno <i>Lewis</i> y y doxorubicin. Carcinomas.
Techniclone Int. Y Techniclone InVAlpha Therapeutic	ChTNT-1/b, ChTNT-1/b, Oncolym™	1. Ab quimérico. Linfoma de células B de Non-Hodgkin, tumores sólidos. 2. Ab quimérico radioetiquetado. Glioma maligno. 3. Ab anti HLA-DR quimérico radioetiquetado con linfoma Non-Hodgkin ¹³¹ I.
Novartis IDEC Pharm.	MAb anti-idiotipo IDEC-Y2B8, IDEC-InB8 IDEC-InB8	Cánceres. 1. Linfoma de células B de Non-Hodgkin. Combinación con Rituximab®. 2. Linfoma de células B de Non-Hodgkin.

Tabla 1 (Continuación)

Anticuerpos representativos en Evaluación Clínica (Continuación)

Institución/Compañía	Anticuerpos	Características/Aplicación (en orden)
CÁNCER		
Neoprobe	RIGScan® CR49	MAb para creación de imágenes de cáncer colorrectal. Solicitud presentada.
Cytogen	OncoRad® PR CYT-356-Y-90, OncoScint	1. Radioterapia in situ con anticuerpo de carcinoma pan etiquetado ⁹⁰ Y. Cáncer de próstata. 2. Detección, determinación de etapa y seguimiento de cáncer de mama.
Medarex	MDX-447, MDX-H210, MDX-220	1. Ab bioespecífico. Cánceres de la cabeza y el cuello, cánceres renales. Ab bioespecífico. Mama, colorrectal, renal, ovárico, de próstata. Ab bioespecífico. Cánceres.

26

Immunomedics	CEA-Cide™, hMN14, CEA-Scan™, LymphoScan™, Lymphocide™, AFP-Scan™, ImmuRAIT-CEA, ImmuRAIT-LL2	1. Ab anti-CEA humanizado. Cánceres positivos CEA. 2. MAb anti-CEA etiquetado ⁹⁹ mTc. Cáncer de mama y pulmón. 3. Determinación de etapa y enfermedad residual en linfoma de células B Non-Hodgkin. 4. Ab humanizado anti-CD22 etiquetado ⁹⁹ mTc. Linfoma B Non-Hodgkin. 5. Fragmento Fab etiquetado ⁹⁹ mTc contra gélulas germinales. Determinación de fase de cáncer de células germinales y hepático. 6. MAb etiquetado ¹³¹ I anti-CEA. Cáncer colorrectal. 7. MAb etiquetado ¹³¹ I. Linfoma B de Non-Hodgkin.
Millenium	Campath 1 LDP-03	Ab humanizado anti-CD52. Leucemia linfocítica crónica.
Protein Design Labs/Kanebo, y Protein Design Labs/Hoffmann-La Roche	SMART™ M195, SMART™ 1 D10, Zenapax®	1. Ab humanizado anti-CD33. Leucemia mieloide aguda. Leucemia promielocítica aguda. 2. Linfoma de Non-Hodgkin de Ab humanizado anti-HLA. 3. Ab humanizado anti-CD25. Leucemia mieloide avanzada. Ciertos cánceres de la sangre.
Altarex ICOS	OvaRex Anti-ICAM 3	MAb anti-CA 125. Cáncer ovárico. Ab humanizado. Tratamiento de cáncer.

DESÓRDENES AUTOINMUNES

Celltech/Bayer	CDP 571	Ab alfa anti-TNF humanizado. Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa. Artritis reumatoide.
Protein Design Labs	SMART™ anti-CD3	Ab anti-CD3 humanizado. Enfermedades autoinmunes.
IDEC/Smith Kline, IDEC, IDEC/Glaxo/Smith Kline	Clenoliximab, IDEC-131, IDEC 151.	1. Ab humanizado. Artritis reumatoide. 2. Ab anti-CD40 L humanizado. Lupus eritematoso sistémico. Esclerosis múltiple. 3. Ab primatizado anti-CD4. Artritis reumatoide.
Biogén	Anti-CD40L	Ab humanizado. Lupus, púrpura trombocitopénica inmune.
Alexion	H5G1.1	Ab anti-C5 humanizado. Tratamiento de artritis inducida por colágeno, glomerulonefritis. Artritis reumatoide. Lupus eritematoso sistémico.
Ortho Biotech	Orthoclone	MAb de ratón anti-CD4. Enfermedades autoinmune mediadas por CD4.
Millenium	LDP-02	Ab humanizado anti-α4β7. Colitis ulcerativa.
Cambridge Antibody Technology/BASF	J695	Ab humano anti-IL-12 de biblioteca de fagos. Artritis reumatoide. Enfermedad de Crohn.
Cambridge Antibody Technology/BASF	D2E7	Ab humano alfa anti-TNF de biblioteca de fagos. Artritis reumatoide.
Medarex/Centcon, Medarex/Eisai/Genmab	MDX 33, MDX CD4	1. MAb humano anti-αCD64 (FcR) de ratones transgénicos. Desórdenes hematológicos autoinmunes. Artritis reumatoide.

ENFERMEDAD CARDÍACA/VASCULAR Y DESÓRDENES SANGUÍNEOS

27

Repligen	h60.1	Ab de anti CD11 B humanizado. Isquemia/reperfusión en aneurisma toracoabdominal.
Alexion Pharm.	h5G1.1	ScFv de anti C5 humanizado. Ataque, infarto del miocardio y trauma quirúrgico.
Genentech	Anti-CD18	Fab'2 humanizado anti-CD18. Infarto del miocardio agudo.
Boehringer Ingelheim	BIRR-1	MAB anti-ICAM 1. Prevención de daño de reperfusión.

Tabla 1 (Continuación)

Anticuerpos representativos en Evaluación Clínica (Continuación)

Institución/Compañía	Anticuerpos	Características/Aplicación (en orden)
Centocor	Capiscint, ReoPro®	1. Agente de creación de imágenes de placa aterosclerótica. 2. Ab anti-gpIIbIIIa quimérico. Angina inestable. Infarto del miocardio agudo. Fab.
American Biogenetic Sci.	MH1-Fab	Trombosis cardiovascular de creación de imágenes in vivo.
ICOS	NHu23F2G	Moléculas anti-adhesión de Ab humanizado. Infarto del miocardio. Choque Hemorrágico. Ataque isquémico.
Biogén Centocor	VL4-A integrin Corsevin™ M	Ab humanizado. Arteriopatía. Fab anti-Factor VII o creación de imágenes. Coagulación intravascular diseminada.

DESÓRDENES NEUROLÓGICOS

Boehringer Ingelheim ICOS	Enlimomab NHu23F2G, Rovelizumab	Ab anti-ICAM. Ataque. Moléculas de anti.adhesión de Ab humanizado. Esclerosis múltiple.
Athena Neurosciences	Antegren™	Anticuerpo humanizado anti-LMF. Enconos de esclerosis múltiple.
Millenium Protein Design Labs/ Hoffmann- La Roche Centocor IDEC Pharm	LDP-01 Zenapax® daclizumab ReoPro® abciximab IDEC 131	Integrina de beta 2 humanizada. Ataque. Ab humanizado anti-CD25. Paraparesis espástica tropical. Ab de anti gpIIbIIIa quimérico. Ataque. Ab anti-CD40L humanizado. Esclerosis múltiple.
Cambridge Antibody Technology/BASF T Cell Sciences	J695 ATM027	Ab humano anti-IL-12 de biblioteca de fagos. Esclerosis múltiple. Anticuerpo humanizado. Esclerosis múltiple.

INFLAMACIÓN

Cell Genesys	Anti-selectins	Ab humanizados. Enfermedad inflamatoria.
ICOS	NHu23F2G	Moléculas anti-adhesión de Ab humanizado. Enfermedad inflamatoria.
Protein Design Labs	Anti-E/P y L selectins	Anticuerpos humanizados. Trauma, ataque, enfermedades inflamatorias del tracto digestivo y reperfusión.
Boehringer Ingelheim	Anti-ICAM-1	MAB anti-ICAM 1 murino. Quemaduras.

TRASPLANTE

Boehringer Ingelheim	Anti-ICAM-1	MAB anti-ICAM 1 murino. Fase II/III para rechazo de trasplante de riñón.
BioTransplant Medimmune	BTI-322, T10B9	1. MAB de rata anti-CD2. Rechazo de aloinjerto. 2. Receptor de células Anti-T. Rechazo de autoinjerto.
Medimmune	MEDI-507, MEDI-500	1. Ab humanizado anti-CD2. GVHD. Rechazo agudo de trasplante de riñón. 2. Ab humanizado anti-TCR $\alpha\beta$. GVHD.
Sandoz Abgenix	Anti-CD25 ABX-CBL	Ab humanizado. Rechazo de autoinjerto. MAB humano anti-CD 147 (CBL) de ratones transgénicos. GVHD. Rechazo de autoinjerto.
Millenium	LDP-01	Integrin de beta 2 humanizado. Trasplante de riñón.
Bristol-Myers	CTLA-4	Immunoligando con actividad anti-CD28. Rechazo de aloinjerto.
Protein Design Labs, Protein Design Labs/ Hoffmann- La Roche	SMART TM anti- CD3 Zenapax TM daclizumab	1. Ab anti-CD3 humanizado. Trasplante. 2. Ab anti-CD25 humanizado. Trasplante de hígado. Trasplante de riñón pediátrico. Rechazo de trasplante de riñón con eliminación de ciclosporina.
Ortho Biotec y Ortho/ Novum	OKT4A, hOKT-4 ^a	1. MAB de ratón anti-CD4. Profilaxis de rechazo de aloinjerto. 2. Versión humanizada de MAB anti-CD4 OKT4. Rechazo de aloinjerto.

Tabla 1 (Continuación)

Anticuerpos representativos en Evaluación Clínica (Continuación)

Institución/Compañía	Anticuerpos	Características/Aplicación (en orden)
Pasteur Merieux/Immunotech Biogén	Anti-LFA1 Antova	MAB murino anti-CD18. Rechazo de aloinjerto. Ab anti-CD40L humanizado. Rechazo de aloinjerto.

DESÓRDENES DE LA PIEL

Genentech	hu1124	Ab humanizado anti-CD11. Psoriasis moderada a severa.
ICOS CIMAB SA, Habana Medimmune Abgenix	ICM3 ior-41 MEDI-507 ABX-IL8	Ab anti-ICAM 3. Psoriasis. MAB anti-CD6. Psoriasis. Ab humanizado anti-CD2. Psoriasis. MAB humano anti-IL8 de ratones transgénicos. Psoriasis.
Celltech IDEC/Mitsubishi Cambridge Antibody Technology	CDP-850 IDEC-114 CAT 192	Ab humanizado de E-selectin. Psoriasis. Ab primatizado anti-CD80. Psoriasis. Ab completamente humano anti-TGFB1 derivado de biblioteca de fagos. Enfermedad fibrótica. Cicatrización.
Protein Design Labs, Protein Design Labs/ Hoffmann- La Roche	SMART TM anti- CD3 Zenapax TM daclizumab	1. Ab anti-CD3 humanizado. Psoriasis. 2. Ab anti-CD25 humanizado. Psoriasis.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Knoll Pharm./BASF	MAK 195F	Fab'2 murino alfa anti TNF. Tratamiento de sepsis.
Immunomedics	LeukoScan®	Creación de imágenes de osteomielitis, prótesis infectada, apendicitis.

Protein Design Labs,	Protovir™,	1. Ab humanizado anti-CMV. Infección en trasplante de hígado.
Protein Design Labs/	SDZ OST 577	2. MAb humano anti-HBsAg. Infección en trasplante de hígado.
Novartis	SDZ MSL 109	3. MAb humano anti-HBsAg. Infección.
Progenics/Genzyme	PRO 542	Ab humanizado anti-gp120 HIV. Neutralizante.
Transgenics	HNK20	MAb IgA murino anti RSV Fgp. Infección respiratoria.
Peptide Therap.		slgA quimérico anti- <i>Streptococcus mutans</i> producido en tabaco transgénico. Tratamiento complementario para la prevención de caries.
Planet Biotechnology	CaroRx™	

DESÓRDENES RESPIRATORIOS Y ALÉRGICOS

Biogen	Anti-VL4-A integrin	Anticuerpo humanizado. Asma.
Genentech/Tamox/Novartis	rhuMabE25	Ab anti IgE humanizado. Fiebre de heno. Asma alérgico. Rinitis alérgica.
IDEC Pharm	IDEC-152	Ab primatizado anti-CD23. Alergia. Asma.
Glaxo/Smith Kline	SB-240563,	1. Ab humanizado anti-IL5. Alergia. Asma.
		2. Ab SB-240683 humanizado anti-IL4. Alergia. Asma.
CellTech/Schering	SCH 55700	Ab humanizado anti-IL5. Alergia. Asma.

MISCELÁNEOS

Cambridge Technology	Antibody	CAT 152	Ab completamente humano anti-TGFB2 derivado de biblioteca de fagos. Cirugía de glaucoma.
Medarex		MDX-RA	Inmunotoxina. Prevención de cataratas secundarias.
ICOS		IC14	Ab anti-CD14. Choque tóxico.

Se podría prever el uso del iELISA en forma de estuche. Anticuerpos contra antígenos específicos podrían aplicarse previamente placas, seguidos por el bloqueo de superficie sólida no recubierta. Estas placas serían entonces estables y podrían almacenarse a 4°C durante varios meses. El antígeno marcado con peroxidasa es también estable durante varios meses a 4°C. Muestras de prueba podrían añadirse en cualquier momento dentro de esta ventana de estabilidad de reactivo en una investigación o escenario clínico.

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 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.

2
31

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 sub-clases 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 primarias. 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.

23
32

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

90/33

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

2634

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 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 antisueños 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.

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 µg/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 µl/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 µl/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 µl/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 75µl de 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 µl/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 µg/kg de MPO con 0.5 mg/kg de Titermax (coadyuvante) con refuerzo subsiguiente de 100 µg/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

~~39~~
39

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 µg/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 µg/kg/día de MPO después de varios ciclos de tratamiento quimioterapéutico de docetaxel y a pacientes de linfoma se les dieron 7.5 µg/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

gt
40

inducida por quimioterapia. Se examinó el suero de monos rhesus normales inmunizados con PMP por vía subcutánea durante 10 días con 50 $\mu\text{g/kg/día}$. 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 $\mu\text{g/kg/día}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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).

Ejemplo 6 Medición de un Anticuerpo de TNF α exógeno

Una superficie de soporte, tal como una placa de microtitulación de 96 celdillas, se recubre previamente con un anticuerpo purificado (bien sea purificado de afinidad, monoclonal o sintético) para TNF α . TNF α etiquetado y una muestra de prueba, tal como suero de un paciente que ha sido tratado con un Mab anti-TNF α , como Remicade (Infliximab), CDP-870 ó D2E7 (adalimumab), se co-incuban en la celdilla de microtitulación recubierta con anticuerpo. El Mab anti-TNF, Remicade (Infliximab), CDP-870 ó D2E7 (adalimumab), deben enlazar el TNF α etiquetado e inhibir así el ligamiento del TNF α etiquetado al anticuerpo enlazado a la placa. La concentración de anticuerpo en el fluido biológico podría determinarse mediante inhibición porcentual relativa a un anticuerpo anti-TNF α estándar.

Ejemplo 7 Medición de un Anticuerpo CD20 exógeno

Una superficie de soporte, tal como una placa de microtitulación de 96 celdillas, se recubre previamente con un anticuerpo purificado (bien sea purificado de afinidad, monoclonal o sintético) a un ligando CD20. Ligando CD20 etiquetado y una muestra de prueba, tal como suero de un paciente que ha sido tratado con un Mab anti-CD20, como Rituxan (Rituximab), se co-incuban en la celdilla de microtitulación recubierta con anticuerpo. El Mab de ligando anti-CD20, Rituxan (Rituximab), debe

43
42

enlazar el ligando CD20 etiquetado e inhibir así el enlazamiento del ligando CD20 etiquetado al anticuerpo enlazado a la placa. La concentración de anticuerpo en el fluido biológico podría determinarse mediante inhibición porcentual relativa a un anticuerpo anti-CD20 estándar.

Ejemplo 8 Medición de un Anticuerpo HER 2 exógeno

Una superficie de soporte, tal como una placa de microtitulación de 96 celdillas, se recubre previamente con un anticuerpo purificado (bien sea purificado de afinidad, monoclonal o sintético) a HER 2. HER 2 etiquetado y una muestra de prueba, tal como suero de un paciente que ha sido tratado con un Mab anti-HER 2, como Herceptin (Trastuzumab), se co-incuban en la celdilla de microtitulación recubierta con anticuerpo. El Mab anti-HER 2, Herceptin (Trastuzumab), debe enlazar el TNF α etiquetado e inhibir así el ligamiento de Her 2 etiquetado al anticuerpo enlazado a la placa. La concentración de anticuerpo en el fluido biológico podría determinarse mediante inhibición porcentual relativa a un anticuerpo anti-HER 2 estándar.

Ejemplo 9 Medición de niveles de un Anticuerpo IgE endógeno

En esta forma del ELISA el 'antígeno' es un anticuerpo anti-IgE. Una superficie de soporte, tal como una placa de microtitulación de 96 celdillas, se recubre previamente con un anticuerpo purificado (bien sea purificado de

44
43

afinidad, monoclonal o sintético) a anticuerpos de clase IgE. Un anticuerpo anti-IgE etiquetado y una muestra de prueba, tal como suero de un paciente que ha sido sensibilizado con un alérgeno, se co-incuban en la celdilla de microtitulación recubierta con anticuerpo. El anticuerpo IgE, debe enlazar el anti-IgE etiquetado e inhibir así el ligamiento del anti-IgE etiquetado al anticuerpo anti-IgE enlazado a la placa. La concentración de anticuerpo en el fluido biológico podría determinarse mediante inhibición porcentual relativa a un anticuerpo anti-HER 2 estándar.

Información adicional sobre ELISA y otros inmunoensayos de fase sólida puede encontrarse en Kemeny D. M. y Challacombe S. J. *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays Theoretical and Practical Aspects*, John Wiley & Sons, (1988).

Métodos para producir anticuerpos aptos para uso en la presente invención son bien conocidos por aquellas personas con habilidades en el arte y pueden hallarse descritos en publicaciones tales como Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), y Assai, *Methods in Cell Biology Vol. 37: Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York (1993). Métodos para producir anticuerpos fabricados son igualmente bien conocidos por aquellas personas con habilidades en el arte y pueden encontrarse en publicaciones tales como Gavilondo, J. V., y colegas, *Biotechniques*, 29:128-145 (2000) y Hudson P. J. *Current Opinion in Immunology* 11:548-557 (1999). Métodos para

2/44

producir anticuerpos en plantas adecuados para uso en la presente invención son bien conocidos por aquellas personas con habilidades en el arte y pueden hallarse descritos en publicaciones tales como Hein, *Biotechnology Process* 7:455 (1991); Zeitlin, *Nature Biotech* 16:1361 (1998); WO 98/10062, Ma, *Eur J Immunol* 24:131 (1994), Schouten, *Plant Mol Biol* 30: 781 (1996), Ravishanker G., *J Biochem., Mol. Biol. Biophysics* 4(2):73-102 (2000); Fisher, R., *Biol. Chem.* 380:825-839 (1999); Russel, D. A., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:119-138 (1999); y Smith M. D., *Food Technol. Biotechnol.* 35(3):183-191 (1997). Detalles adicionales sobre anticuerpos de cadena simple y métodos para producirlos pueden encontrarse en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,121,424; 6,103,889; 6,027,725; 6,025,165; 5,990,275; 5,917,021; 5,869,620; 5,856,456; 5,757,260; 5,763,733; 5,656,730; 5,534,621; 5,518,889; 5,455,030; y 5,260,203.

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.

96
45

LO QUE SE REIVINDICA ES:

Hydroxyl

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 endógeno.

VI

3.

El método de la reivindicación 2 en donde dicho anticuerpo endógeno es contra un polipéptido recombinante.

NI

4.

El método de la reivindicación 3 en donde dicho polipéptido recombinante se selecciona del grupo conformado por MPO, PMP y ProGP.

4/6

5. El método de la reivindicación 2 en donde dicho anticuerpo endógeno es contra una vacuna.

6. El método de la reivindicación 1 en donde dicho primer anticuerpo es un anticuerpo exógeno.

7. El método de la reivindicación 6 en donde dicho anticuerpo exógeno se selecciona del grupo conformado por una inmunoglobulina intacta, un fragmento FV, un fragmento Fab, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

8. El método de la reivindicación 7 en donde dicho anticuerpo exógeno se selecciona del grupo conformado por VitaxinTM, PE38, LMB-7, Ch14.18, VerlumaTM, Avicidin, NR-LU-10, CMB-401, CMA-676, hB72.3, PanorexTM, CY1748, MFE-23, HuBrE.3, C225, BEC-2, ior-R3, ior-r3hum, ior-c5, Oncolysin BTM, BR96, ChTNT-1/b, OncolymTM, IDEC-Y2B8, IDEC-InB8, R1GScan® CR49, OncoRad®, PR CYT-356-Y-90, OncoScint®, MDX-447, MDX-H210, MDX-220, CEA-CideTM, hMN14, CEA-ScanTM, LymphoScanTM, LymphocideTM, AFP-ScanTM, ImmuRAIT-CEA, ImmuRAIT-LL2, Campath 1 LDP-03, SMARTTM M195, SMARTTM 1 D10, Zenapax®, OvaRex, Anti-ICAM 3, CDP-571, SMARTTM anti-CD3, Clenoliximab, IDEC-131, IDEC 151, h5G 1.1, Orthoclone OKT4, Orthoclone OKT3 (Muromomab), LDP-02, J695, D2E7, MDX 33, MDX

98
47

CD4, h60.1, h5G1.1, BIRR-1, MH1-Fab, nHu23F2G, VL4-A integrin, CorsevinTM M, Enlimomab, Rovelizumab (nHu23F2G), AntegrenTM, LDP-01, Zenapax®, daclizumab, ReoPro® Abciximab, IDEC 131, J695, ATM027, nHu23F2G, BTI-322, MEDI-507, ABX-CBL, LDP-01, CTLA-4, SMARTTM anti-CD3, ZenapaxTM, daclizumab, OKT4A, hOKT-4A, Anti-LFA1, Antova, hu1124, ICM3, ior-t1, MEDI-507, ABX-IL-8, CDP-850, IDEC-114, CAT 192, SMARTTM anti-CD3, Zenapax®, daclizumab, MAK 195F, LeukoScan®, ProtovirTM, SDZ OST 577, SDZ MSL 109, PRO 542, HNK20, CaroRxTM, rhuMabE25, IDEC-152, SB-240563, SCH 55700, CAT 152, MDX-RA, IC14, Rituxan (Rituximab), Remicade (Infliximab), Simulect (Basiliximab), Herceptin (Trastuzumab), Zenapax (Dacliximab), Synagis (Palivizumab) y CDP-870.

9. El método de la reivindicación 8 en donde dicho anticuerpo exógeno se selecciona del grupo conformado por Orthoclone OKT3 (Muromomab), Rituxan (Rituximab), ReoPro (Abciximab), Remicade (Infliximab), Simulect (Basiliximab), Herceptin (Trastuzumab), Zenapax (Dacliximab), Synagis (Palivizumab), D2E7 (adalimumab), CAT 152, CAT 192, J695 y CDP-870.

10. El método de la reivindicación 9 en donde dicho anticuerpo exógeno se selecciona del grupo conformado por CDP 571, D2E7 (adalimumab), CAT 152, CAT 192, J695 y CDP-870.

49
48
(11.) El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 en donde dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo policlonal purificado.

(12.) El método de la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo policlonal purificado se purifica mediante un método seleccionado del grupo conformado por purificación de afinidad de antígeno, purificación de afinidad de Proteína A y purificación de afinidad de Proteína G.

(13.) El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 en donde dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

(14.) El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13 en donde dicho antígeno se etiqueta con un agente seleccionado del grupo conformado por peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, biotina y fosforescentemente.

15. El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 en donde dicha superficie enlazante o soporte es una celdilla de placa de microtitulación.

(16.) El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 en donde dicha muestra de prueba es un suero de un mamífero.

100
49

17. El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 en donde dicha muestra de prueba es un suero de un humano.

18. 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; *cuál*

un segundo anticuerpo purificado ligado a dicha superficie de enlazamiento o soporte; y *cuál*

un antígeno purificado y etiquetado que específicamente se enlaza y satura dicho segundo anticuerpo. *cuál*

19. 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 además reactivos de lavado, reactivos de incubación y sustrato de etiquetado.

20. El estuche de prueba de la reivindicación 18 ó 19 en donde dicho primer anticuerpo es un anticuerpo endógeno. *resultado*

21. El estuche de prueba de la reivindicación 21 (sic) en donde dicho anticuerpo endógeno es contra un polipéptido recombinante. *r*

701
50

22. El estuche de prueba de la reivindicación 21 en donde dicho polipéptido recombinante se selecciona del grupo conformado por MPO, PMP y ProGP.

23. El estuche de prueba de la reivindicación 20 en donde dicho anticuerpo endógeno es contra una vacuna. *result*.

24. El estuche de prueba de la reivindicación 18 ó 19 en donde dicho primer anticuerpo es un anticuerpo exógeno. *result*

25. El estuche de prueba de la reivindicación 18 ó 19 en donde dicho anticuerpo exógeno se selecciona del grupo conformado por una inmunoglobulina intacta, un fragmento FV, un fragmento Fab, un fragmento (Fab)₂, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. *result*

26. El estuche de prueba de la reivindicación 25 en donde dicho anticuerpo exógeno se selecciona del grupo conformado por VitaxinTM, PE38, LMB-7, Ch14.18, VerlumaTM, Avicidin, NR-LU-10, CMB-401, CMA-676, hB72.3, PanorexTM, CY1748, MFE-23, HuBrE.3, C225, BEC-2, ior-R3, ior-r3hum, ior-c5, Oncolysin BTM, BR96, ChTNT-1/b, OncolymTM, IDEC-Y2B8, IDEC-InB8, R1GScan® CR49, OncoRad®, PR CYT-356-Y-90, OncoScint®, MDX-447, MDX-H210, MDX-220, CEA-CideTM, hMN14, CEA-ScanTM, LymphoScanTM, LymphocideTM, AFP-ScanTM, *result*.

102
51

ImmuRAIT-CEA, ImmuRAIT-LL2, Campath 1 LDP-03, SMART™ M195, SMART™ 1 D10, Zenapax®, OvaRex, Anti-ICAM 3, CDP-571, SMART™ anti-CD3, Clenoliximab, IDEC-131, IDEC 151, h5G 1.1, Orthoclone OKT4, Orthoclone OKT3 (Muromomab), LDP-02, J695, D2E7, MDX 33, MDX CD4, h60.1, h5G1.1, BIRR-1, MH1-Fab, nHu23F2G, VL4-A integrin, Corsevin™ M, Enlimomab, Rovelizumab (nHu23F2G), Antegren™, LDP-01, Zenapax®, daclizumab, ReoPro® Abciximab, IDEC 131, J695, ATM027, nHu23F2G, BTI-322, MEDI-507, ABX-CBL, LDP-01, CTLA-4, SMART™ anti-CD3, Zenapax™, daclizumab, OKT4A, hOKT-4A, Anti-LFA1, Antova, hu1124, ICM3, ior-t1, MEDI-507, ABX-IL-8, CDP-850, IDEC-114, CAT 192, SMART™ anti-CD3, Zenapax , daclizumab, MAK 195F, LeukoScan®, Protovir™, SDZ OST 577, SDZ MSL 109, PRO 542, HNK20, CaroRx™, rhuMabE25, IDEC-152, SB-240563, SCH 55700, CAT 152, MDX-RA, IC14, Rituxan (Rituximab), Remicade (Infliximab), Simulect (Basiliximab), Herceptin (Trastuzumab), Zenapax (Dacliximab), Synagis (Palivizumab) y CDP-870. *result*

27. El estuche de prueba de la reivindicación 24 en donde dicho anticuerpo exógeno se selecciona del grupo conformado por Orthoclone OKT3 (Muromomab), Rituxan (Rituximab), ReoPro (Abciximab), Remicade (Infliximab), Simulect (Basiliximab), Herceptin (Trastuzumab), Zenapax (Dacliximab), Synagis (Palivizumab), D2E7 (adalimumab), CAT 152, CAT 192, J695 y CDP-870. *result*

103
52

28. El estuche de prueba de la reivindicación 24 en donde dicho anticuerpo exógeno se selecciona del grupo conformado por CDP 571, D2E7 (adalimumab), CAT 152, CAT 192, J695 y CDP-870. *resol*

29. El estuche de prueba de la reivindicación 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ó 28 en donde dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo policlonal purificado. *UI*

30. El estuche de prueba de la reivindicación 29 en donde dicho anticuerpo policlonal purificado se purifica mediante un método seleccionado del grupo conformado por purificación de afinidad de antígeno, purificación de afinidad de Proteína A y purificación de afinidad de Proteína G. *UI*

31. El estuche de prueba de la reivindicación 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ó 28 en donde dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. *UI*

32. El estuche de prueba de la reivindicación 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 en donde dicho antígeno se etiqueta con un agente seleccionado del grupo conformado por peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, biotina y fosforescentemente.

104
53

33. El estuche de prueba de la reivindicación 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ó 32 en donde dicha superficie enlazante soporte es una celdilla de placa de microtitulación.

34. El estuche de prueba de la reivindicación 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ó 33 en donde dicha muestra de prueba es un suero de un mamífero.

35. El estuche de prueba de la reivindicación 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ó 33 en donde dicha muestra de prueba es un suero de un humano.

104
53

EXTRACTO

107
54

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.

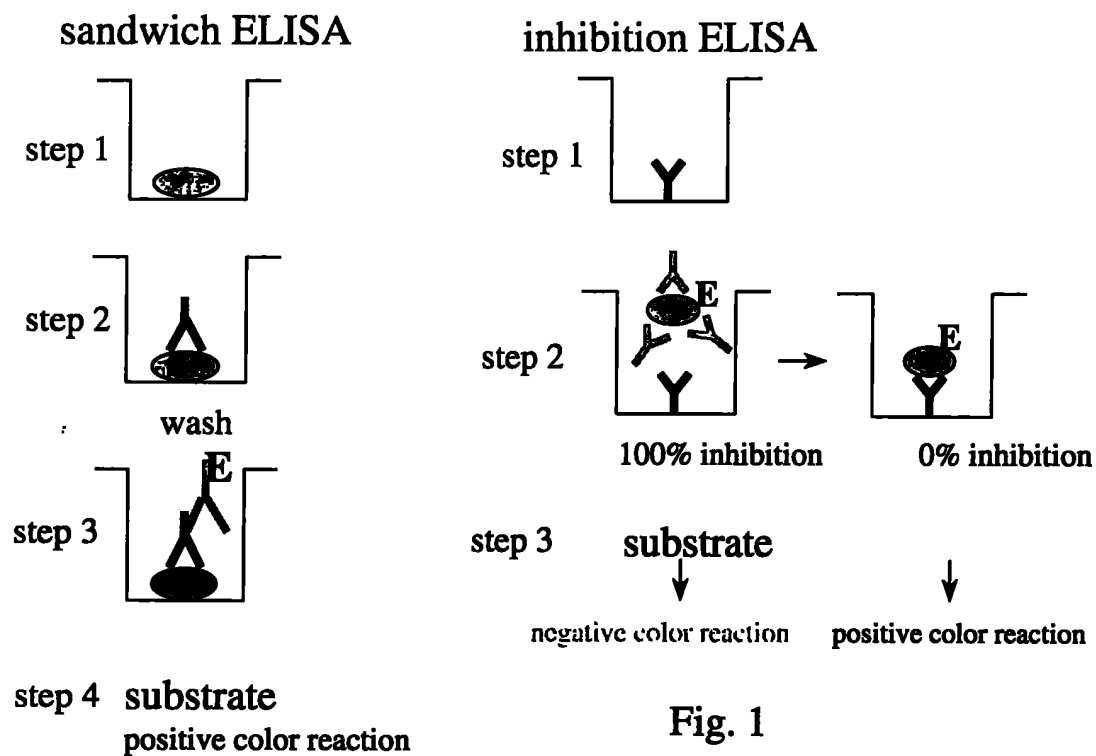
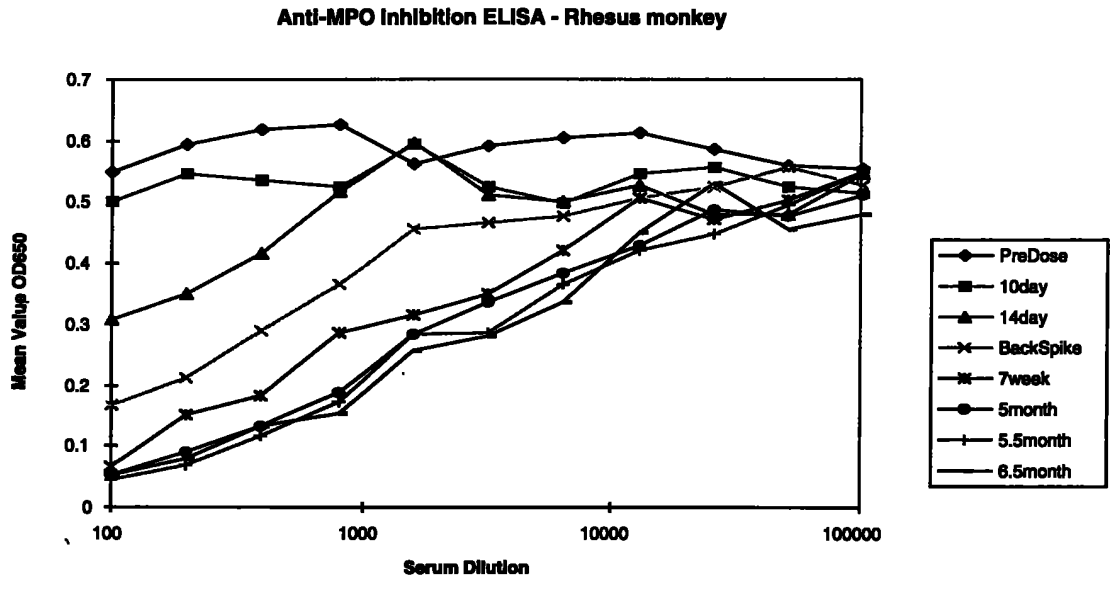


Fig. 1

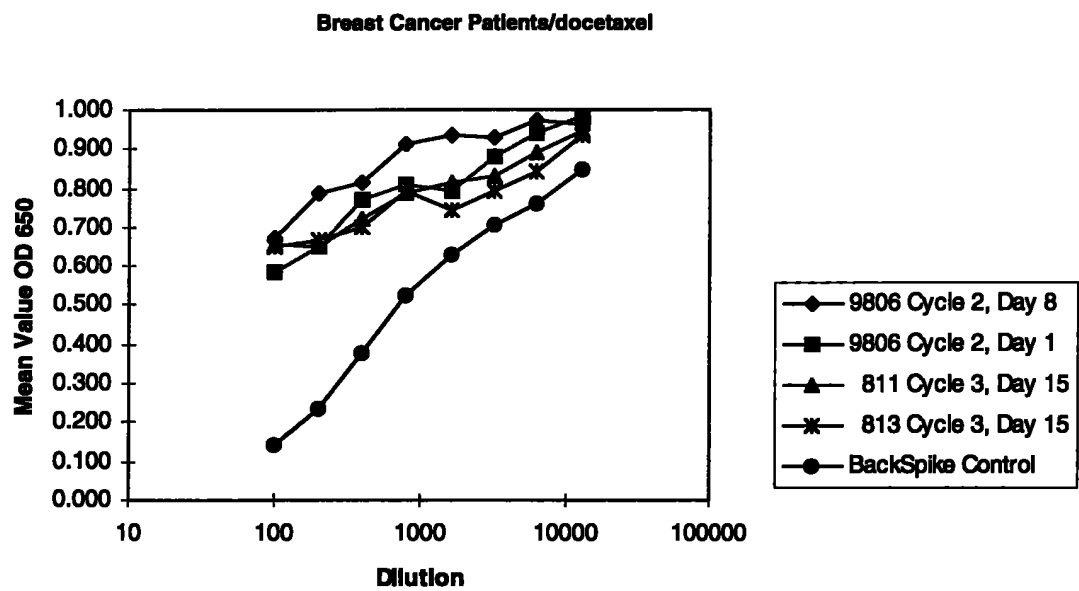
106

Fig. 2



Handwritten signature or mark.

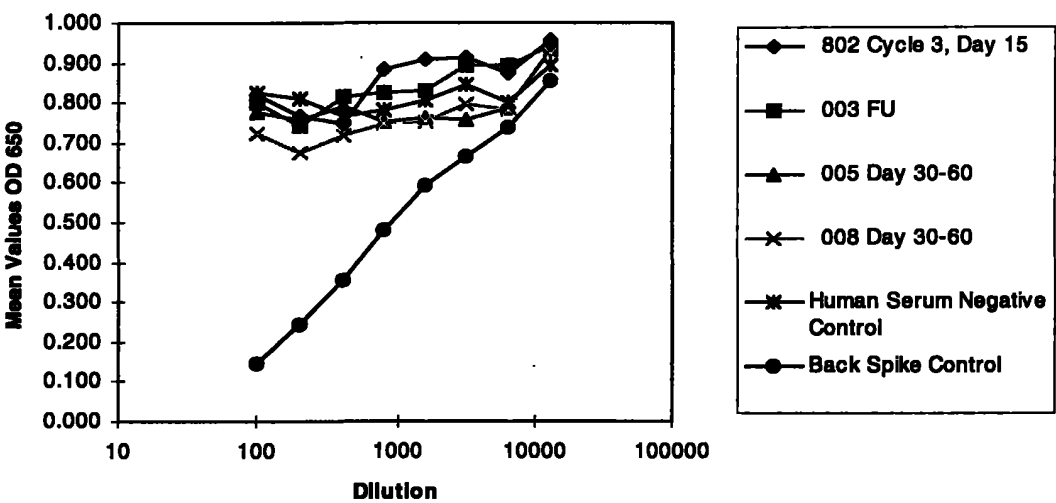
Fig. 3



JP

Fig. 4

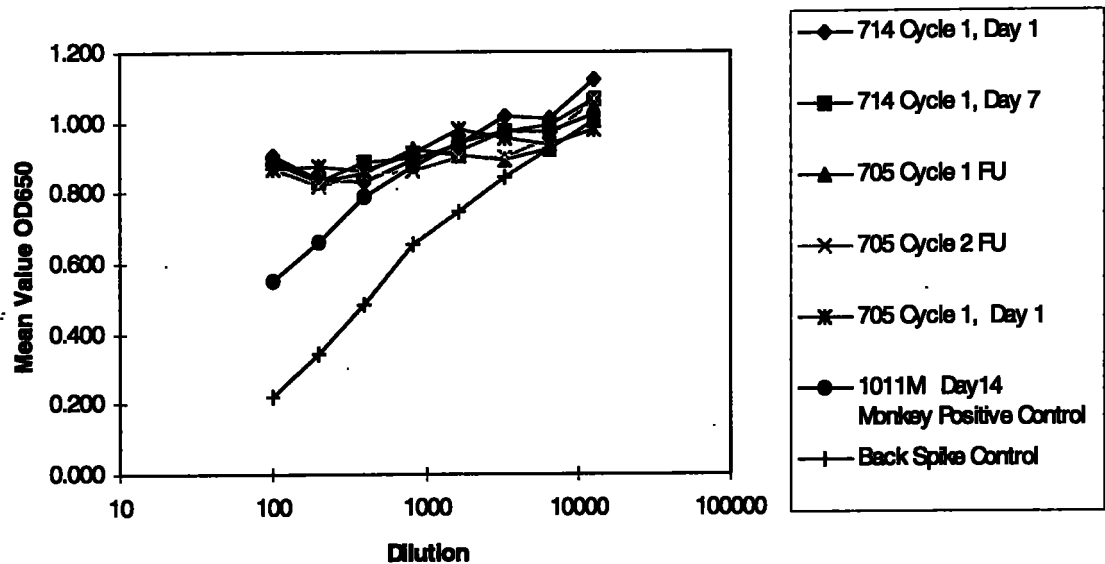
Breast Cancer Patients/docetaxel



Fig

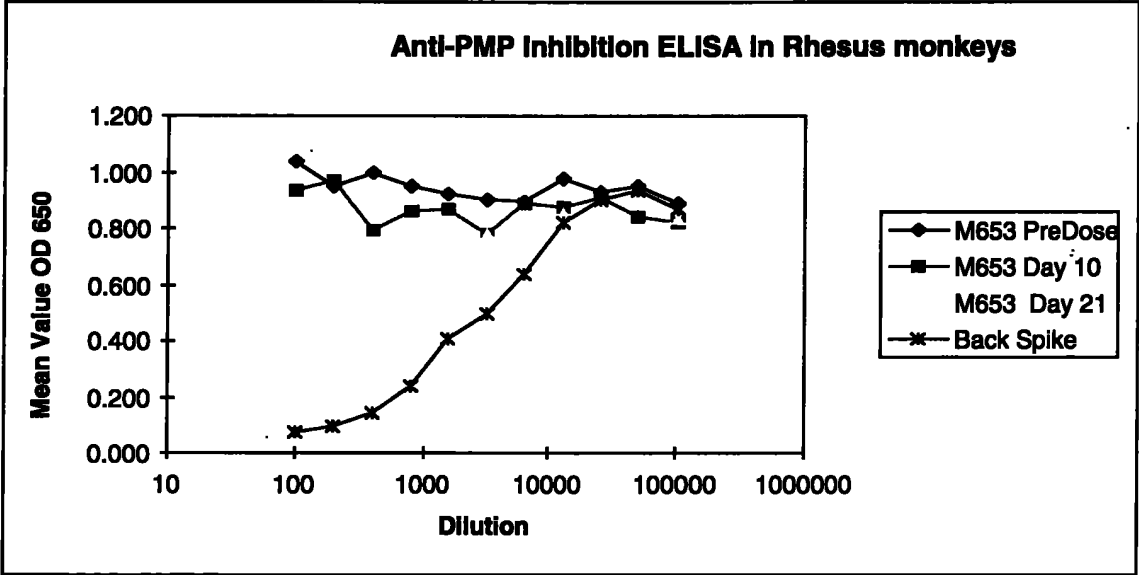
Fig. 5

Lymphoma Cancer Patients/ASHAP



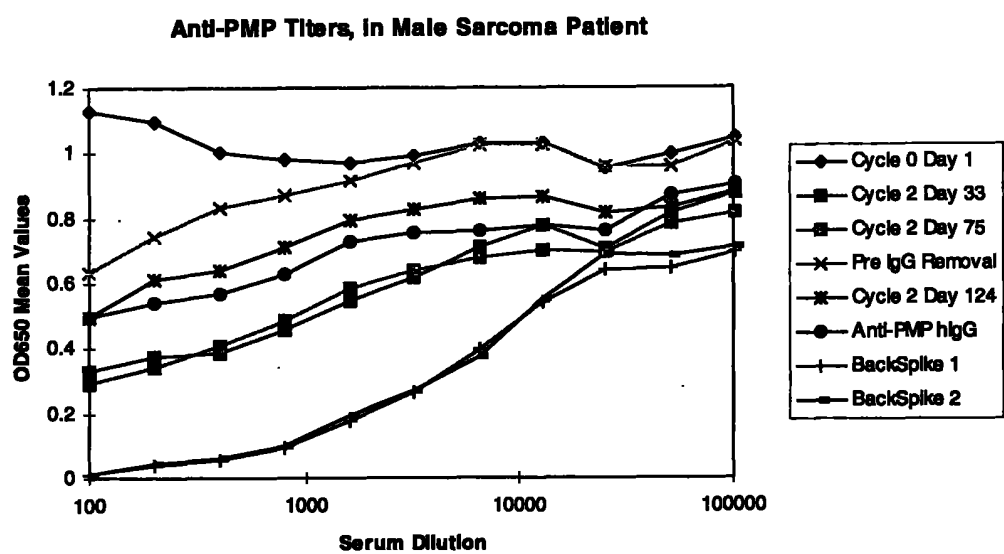
FE

Fig. 6



7

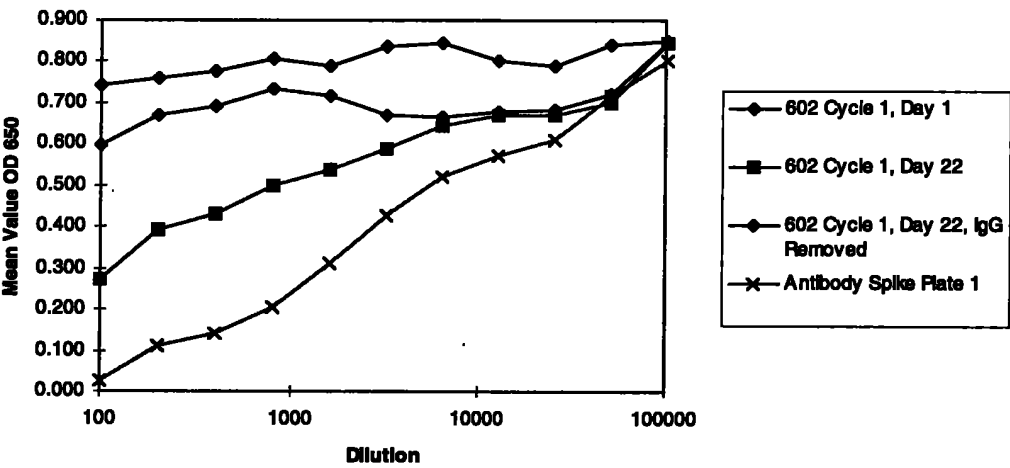
Fig. 7



17

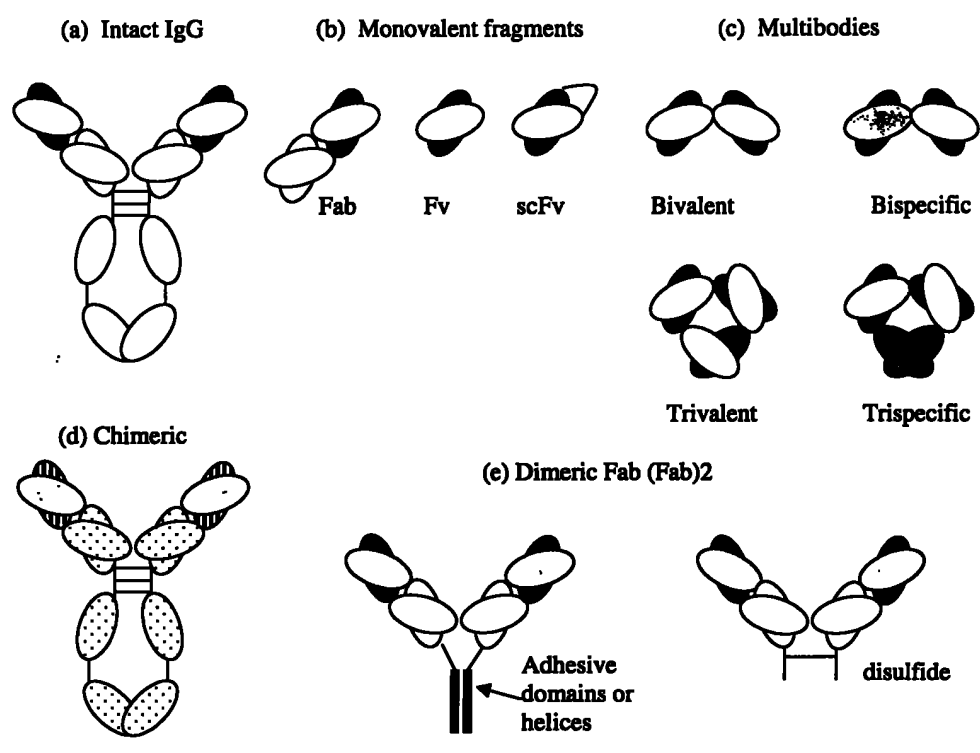
Fig. 8

Protein G IgG Removal From Patient With Positive Titer



173

Fig. 9



Handwritten signature or mark.

REQUISITOS MINIMOS PARA AD

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00076267 00000000

Folios: 114

Fecha (AMB): 2000-10-06 16:59:36

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRADO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION []

- Nombre e identificación del Solicitante []
- Nombre e identificación del Inventor []
- Título o nombre de la Invención []
- Descripción []
- Reivindicaciones []
- Resumen []
- Comprobante de Pago []
- Poder, cuando proceda []
- Copia de la primera solicitud de patente, si reivindica prioridad, señalándola expresamente []
- Firma del solicitante o apoderado []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []
- Poder, cuando proceda []
- Firma del solicitante o apoderado []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 261 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-76267

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- | | | |
|--|--|--|
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a). |
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94). |
| SI ☒ | NO ☐ | NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000) |
| SI ☒ | NO ☐ | EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París. |
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional. |
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.). |
| SI ☐ | NO ☒ | CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS |

BSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: Deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

- | | | |
|-----------------------------|--|--|
| SI ☐ | NO ☒ | Se ajusta a los aspectos FORMALES indicados en la Decisión 344 y por tanto, |
| SI ☐ | NO ☒ | Se recomienda PUBLICAR el extracto correspondiente. |

Bogotá, D.C., 9 de Octubre del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.
202022

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.
PRIMER EXAMEN DE FORMA.**

Radicación No. 00-76267

Concepto Técnico No. 1735

Clasificación Internacional de Patentes: G01N 33/541

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art. 8, Art 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Art. 13-a)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art. 13-e)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art. 13-b)
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art. 13-c)
- SI ☐ NO ☒ Contiene los dibujos correctos (Art. 14-c junto con el literal d) del Art. 4 del (Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art. 14-c junto con el Dto. 3484 del 26 de diciembre de 1980)
- SI ☐ NO ☒ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art. 13-d).
- SI ☐ NO ☒ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 del 94.
- SI ☐ NO ☒ Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P-104) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☐ NO ☒ **CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA.**

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA:

1. Las Figuras presentan textos en Inglés, por consiguiente deben ser modificadas de modo que toda la solicitud esté escrita en castellano.
2. Aunque el uso de las expresiones "anticuerpos endógenos" es propio del sector tecnológico, sería recomendable aclarar a que debe entenderse por esta expresión.

EXAMINADOR TÉCNICO: 202016.

Bogotá, D.C., 02 de noviembre de 2000

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-76267

AUTO 3619

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndolo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

N TIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Bogotá D.C., a los _____

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Bogotá D.C., _____ notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO 27-12-2000

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ☒ NO ☐

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA 09-02-2001

202022