



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



08-75690

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

PRUEBA DE ACTIVACION DE MONOCITO MEJORADA PARA TENER MEJOR
CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES PIROGENICOS SIN
ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MEDICOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A. y
NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD

DOMICILIO

DEERFIELD, ILLINOIS, U.S.A., ZURICH, SUITZA, Y
POTTERS BAS HERTFORDSHIRE, REINO UNIDO, RESPECTIVAMENTE

74. APODERADO

EMILIO FERRERO
CC. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-075690- -00000-0000

Fecha: 2008-07-22 16:13:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

22 Julio 2008

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.

☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S. A. y NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD**
sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, Suiza y Reino Unido, respectivamente.

Dirección: One Baxter Parkway,
Deerfield,
Illinois 60015,
Estados Unidos de América

Y

Hertistrasse 2,
Wallisellen, Kanton,
8304 Zurich,
Suiza

Y

Blanche Lane,
South Mimms,
Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG,
Reino Unido

Domicilio: Deerfield,
Illinois,
Estados Unidos de América

Y

Zurich,
Suiza

Y

Potters Bar Hertfordshire,
Reino Unido

Respectivamente

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

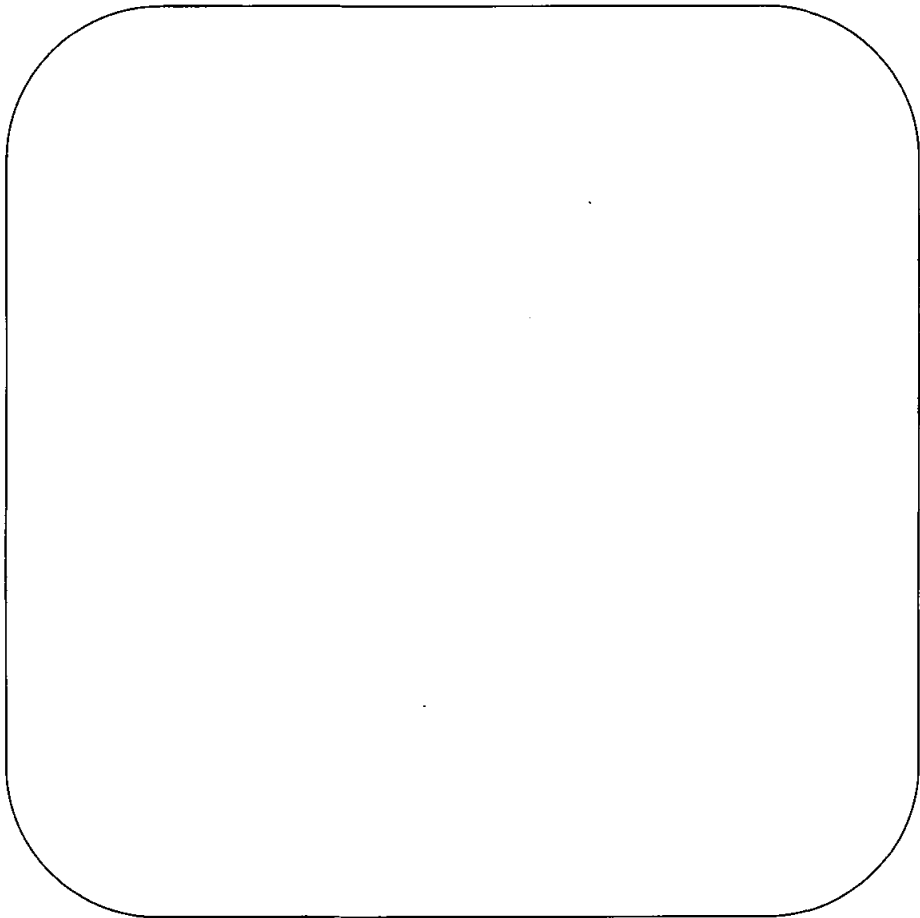
Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)	1. Stephen POOLE 72 Grasmere Avenue, Londres SW19 3DX, Reino Unido		2. Mehul PATEL 2821 Shoshone Trl, Lafayette, Colorado 80026, Estados Unidos de América	
5 PCT (86)	Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2006/062424</u>		Fecha: <u>20 de diciembre de 2006</u>	
	Publicación Internacional No. <u>WO 2007/076411 A1</u>		Fecha: <u>5 de julio de 2007</u>	
6 Título (54)	<u>PRUEBA DE ACTIVACION DE MONOCITO MEJORADA PARA TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES PIROGENICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MEDICOS</u>			
7 Clasificación Internacional (51)	<u>G01N 033/068</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>22 de diciembre de 2005</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/752,970</u>	
9	Comprobante de pago No.: <u>08-39,887</u>		Fecha: <u>19 de mayo de 2008</u>	
10	Anexos:			
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.00.			
☐	Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.			
☒	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.			
☒	Poderes, de las compañías BAXTER INTERNATIONAL INC, y BAXTER HEALTHCARE S.A.			
☒	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.			
☐	Declaraciones.			
☒	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)			
☒	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)			
☐	Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.			
☐	Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.			
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.			
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.			
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.			
☐	Arte final 12x12			
☐	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.			
☒	Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS			

11

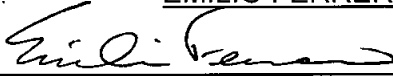
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

ov NNJ

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/076411 A1

Descripción:

Páginas 29 en el idioma original

Páginas 48 en español

Reivindicaciones: Número (s) 37

Figuras: Número (s) 15

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

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

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

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER-OF- ATTORNEY

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

BAXTER HEALTHCARE S.A.

domiciliado (s) en/of Hertistrasse 2,

CH-8304 Wallisellen, SUIZA

por el presente ratificamos la solicitud de patente que se tramita en el expediente N° 06.127.737

presentada por Emilio FERRERO
como agente oficioso ante la División de Nuevas Creaciones

en Bogotá, Colombia

el _____

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar.

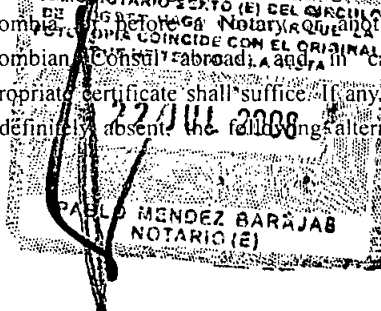
hereby ratify the patent application under File N° 06.127.737

filed without a Power of Attorney by Emilio FERRERO
before "División de Nuevas Creaciones"

in Bogotá, Colombia

on December 20, 2006.

and do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad, and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place.



...cesare la ausencia o impedimento del representante principal, de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 7-02-08

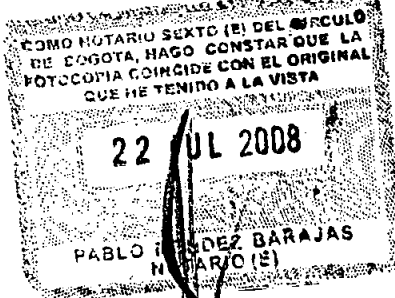
en/in Quito, Pz.

por/by R. Binggeli

Firma

Ignacio Martinez de Lecea
Corporate Counsel

R. Binggeli
Director of Tax, Europe
Baxter Healthcare SA



Official Certification

Seen for authentication of the signatures in front, affixed by

- Rebecca Elaine Binggeli-Wacaser, born 1st of November 1969, citizen of the United States of America, residing at Bälstrasse 43, 8194 Hüntwangen, who is personally known to us,
- Ignacio Martinez de Lecea, born 19th February 1971, citizen of Spain, residing at Brandschenkestrasse 72, 8002 Zurich,

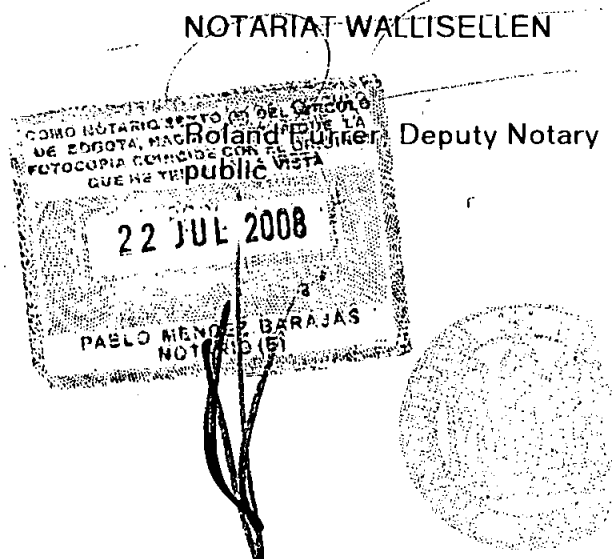
who, according to our electronic data recall of today (state of data: 8th February, 2007, are entered in the Commercial Register with the right to sign jointly by two for the

Baxter Healthcare SA, having its registered domicile in Wallisellen, Switzerland.

The signatures have been acknowledged in our presence by the authorized agent, Miss Martina Salomo, who is personally known to us.

Wallisellen, 8th February, 2007

Begl.-Nr. 166/6
CHF 50.--



ACTA NOTARIAL
(Convenida de la Ley de 8 octubre 1981)

1. País: Confederación Suiza, Cantón de Zúrich
Confederación Suiza, Cantón de Zúrich
El presente documento público / Este documento público
2. Ha sido firmado por Peter Schärer
foi assinado por Peter Schärer
3. Actuando en calidad de Notario
na sua qualidade de Notario
4. Se halla sellado/timbrado con/selo previsto de selo/selinho do (da)
Notario

Continúa

5. En/om 8039 Zurich/Zúrich 8. Ene. dia 29. Feb. 2007
7. Por la Capitulación de Zúrich
pela Capitulación de Zúrich
8. Con el número de 317/2007
9. Sello/timbrado 1. Schärer

I. Schärer

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

22 JUL 2008

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

TRADUCCIÓN OFICIAL 082/2007 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE ACUERDO CON EL CUAL **BAXTER HEALTHCARE S.A.**, EMPRESA DOMICILIADA EN HERTISTRASSE 2, CH-8304 WALLISELLEN, SUIZA RATIFICA LA SOLICITUD DE PATENTE QUE SE TRAMITA EN EL EXPEDIENTE No. 06.127.737, PRESENTADA POR EMILIO FERRERO COMO AGENTE OFICIOSO ANTE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EN BOGOTÁ, COLOMBIA Y OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832.

EXPEDIDO Y FIRMADO HOY 7 DE FEBRERO DE 2007 EN ZURICH, SUIZA POR IGNACIO MARTÍNEZ DELECEA ABOGADO SOCIETARIO Y POR R. BINGGELI, DIRECTOR DE IMPUESTOS, EUROPA, BAXTER HEALTHCARE S.A.

CERTIFICACIÓN OFICIAL

Visto para la autenticación de las firmas en el anverso, fijadas por

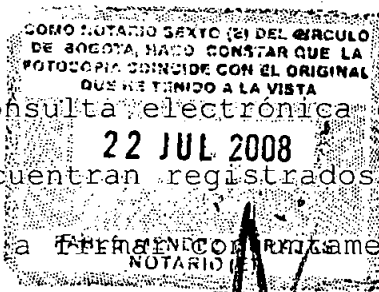
REBECCA ELAINE BINGGELI-WACASER, nacida el primero de noviembre de 1969, ciudadana de los Estados Unidos de América, residente en Bälstrasse 43, 8194 Hüntwangen, a quien conozco personalmente IGNACIO MARTÍNEZ DE LECEA, nacido el 19 de febrero de 1971, ciudadano español, residente en Brandschenkestrasse 72, 8002 Zurich

Quienes, de acuerdo con la consulta electrónica de datos de hoy (8 de febrero de 2007) se encuentran registrados en el registro comercial y tienen el derecho a firmar conjuntamente a nombre de Baxter Healthcare SA, que tiene domicilio registrado en Wallisellen, Suiza.

Sus firmas han sido reconocidas en nuestra presencia por la agente autorizada, señorita Martina Salomo, a quien conocemos personalmente.

Wallisellen, 8 de febrero de 2007.

Firmado: RONALD FURRER, notario público suplente



NOTARIA DE WALLISELLEN

Bel Nr. 165/6

CHF 50.-

Nota de apostilla en español #3170/2007 del 9 de febrero de 2007.

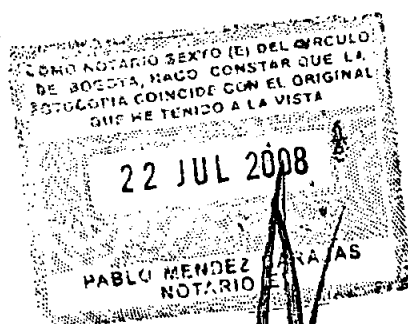
Firmado: I Schärer.

COLO-13936-841-009-4

WPCL002G ID 8719

Bogotá, 11 de abril de 2007.

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
•TRADUCTOR OFICIAL•
INGLES - ESPAÑOL - INGLES
Res. 541. Febrero de 1970



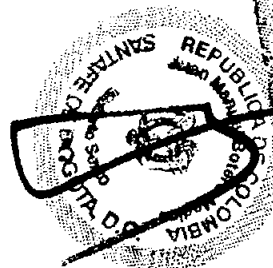
MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2007 APR 11 P 12:44

ucs
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

840156
Edmundo
CITA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESCRIBIDA
LOS QUE SE SANCIONAN
22 JUL 2008
PELO MENDEZ BARRIAS
NOTARIO
CIRCULO DE NOTARIOS DE BOGOTA
CIRCULO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FIRMA QUE HE TENIDO A LA VISTA



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE
Edmundo Mendez Barrías
FIRMA DE
11 ABR 2007
SANTAFE DE BOGOTA
CIRCULO NOTARIO SEXTO (E) EN ESTA NOTARIA
REGISTRADA POR

05873
08613

Transcript - 11/10/93
31712

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado(s)
BAXTER INTERNATIONAL INC.

domiciliado(s) en
Deerfield, Illinois, E.E.U.U.

por el presente conferimos poder a
GERMAN CAVELIER tpa. 832
GONZALO PERDOMO tpa. 831
EMILIO FERRERO tpa. 31929
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ tpa. 23555
Domiciliados en la Carrera 4a. No. 72-35,
Bogotá, Colombia

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas y de servicio; el depósito de nombres comerciales y enseñas; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) las acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y juicios que promovamos o se nos promuevan; y c) para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, desistir, cancelar, recibir, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy junio 16 de 1993
en Deerfield, Illinois 60015 E.E.U.U.

I (we), the undersigned BAXTER INTERNATIONAL INC., ...

of Deerfield, United States of America, ...

hereby grant to Messrs. Cavelier,
GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO,
EMILIO FERRERO, LUZ CLEMENCIA DE
PAEZ.

Professional Cards Numbers: 832, 831, 31929
and 23555 respectively. Domiciled at
Carrera 4a. No. 72-35, Bogotá, Colombia

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, collective and service marks; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us); and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys-in-fact in or out of Court.

Given and signed this JUNE 16, 1993
in DEERFIELD, ILLINOIS 60015 USA
22 JUL 2008

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

BAXTER INTERNATIONAL INC.,

A. GERARD SIECK, ASSISTANT SECRETARY

Bernarda R. de Martínez

Traductora e Interprete Oficial

Resolución 683 Minjusticia 1994



LINDA IANUZI HESS
LAKE COUNTY CLERK
18 NORTH COUNTY STREET
WAUKEGAN, ILLINOIS 60085

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

General Services 708/360-3610 • Elections 708/360-6628 • Tax Extension & Redemption 708/360-6657

STATE OF ILLINOIS)) SS
COUNTY OF L A K E)

CERTIFICATE OF AUTHORITY

I, Linda Ianuzzi Hess, County Clerk of Lake County in the State of Illinois, which office is an office of record having a seal, certify that Mary H. Cross by whom the foregoing or annexed document was notarized, was, on the 26 day of June, 1990, appointed a Notary Public in and for the County of Lake, State of Illinois and that as such, full faith and credit is and ought to be given to this Notary's official attestations. In testimony whereof I have affixed my signature and the seal of this office this 17 day of June, 1993.

Certification not valid unless the seal
of Lake County, Illinois is affixed.

LINDA TANUZZI HESS
LAKE COUNTY CLERK

COMO NOTARIA DEL CONDADO DE ROCK, MISSOURI, PUEDE COPIAR CORRECTAMENTE CON EL ORIGINAL EN UNO DE LOS TEMPLOS A LA VISTA

22 JUL 2008

PABLO ENRIQUEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

113-208 12/89

12



Consulado General de Colombia

122 SOUTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 1441
CHICAGO, ILLINOIS 60603

TEL (312) 341-0658 FAX (312) 341-1980

No. 1610, 93

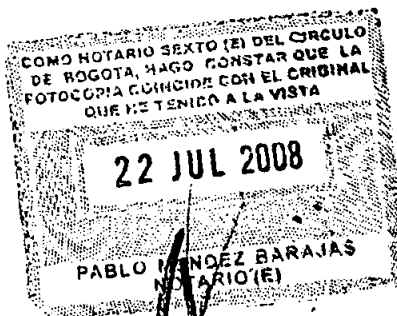
Chicago, JUN 29 1993

El suscrito Cónsul General de Colombia, CERTIFICA que el señor Finca Jamuzi Hess quien autoriza el presente documento, ejercía legalmente, en la fecha allí expresada, las funciones de Secretaria del Condado y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este consulado.

El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
US\$ 6.00 (Seis dólares)
US\$ 15.00 (Quince dólares)
PAGADO DERECHOS CONSULARES
FONDO ROTATORIO

Maria Teresa Gonzalez
MARIA TERESA GONZALEZ
Encargada de Funciones Consulares



Bernardu R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

No. 481652

RECEIVED
U.S. AIR FORCE
OFFICE OF THE ADJUTANT GENERAL
WASHINGTON, D.C.

M. A. Fresca Gonzalez

05 AUG 1993

105 00
105 001 1

D

UNITED STATES AIR FORCE
OFFICE OF THE ADJUTANT GENERAL

COMO NOTARIO TEXTO (2) DEL ARTICULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE ME TENIDO A LA VISTA

22 JUL 2008

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

CERTIFICADO NOTARIAL (CORPORACION)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Estados Unidos de América

United States of America

Condado de Lake

State of ILLINOIS

Estado de Illinois

ss:

ss:

Hoy 16 de junio de 1993

County of LAKE
On this 16th day of June, 1993

compareció A. Gerard Sieck a quien conozco, quien, debidamente juramentado, declaró y dijo que él es SubSecretario

personally came A. GERARD SIECK known to me, who being by me duly sworn did depose and say that he is the ASSISTANT SECRETARY of BAXTER INTERNATIONAL INC.

de BAXTER INTERNATIONAL INC. la compañía, nombrada en el documento que antecede, una corporación organizada conforme a las leyes del Estado de Delaware

the Company named within, a Corporation organized under the laws of the State of DELAWARE domiciled at the City of DEERFIELD

domiciliado en la ciudad de Deerfield

State of ILLINOIS

Estado de Illinois, E.E.U.U. y legalmente constituido para un período de duración que aun no ha terminado, que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder y que el sello estampado por él al pie del poder, en nombre y en representación de la expresada compañía, es el sello social de ella.

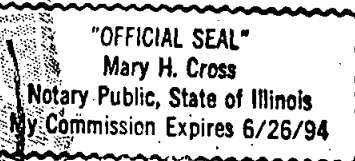
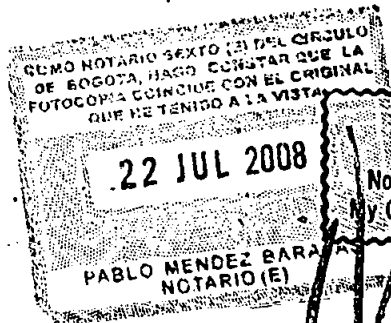
of USA and legally constituted for a period of tenure not yet expired, that the deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney, and that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the Corporate seal thereof.

El suscrito Notario ha visto los estatutos de incorporación firmados en Deerfield Estado de Illinois con fecha oct. 19/31 y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

The undersigned Notary Public has seen the Articles of Incorporation of said Corporation executed at DEERFIELD State of ILLINOIS under date of OCT. 19, 1931 and hereby certifies that under the laws of said State the foregoing acknowledgment is a sufficient proof that the facts therein contained are true, which she attests.

Notary Public (Notario Público)

MARY H. CROSS, NOTARY PUBLIC



Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1994

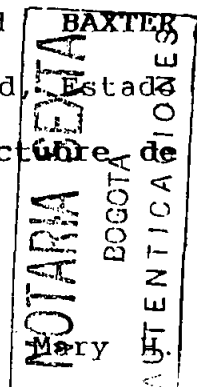
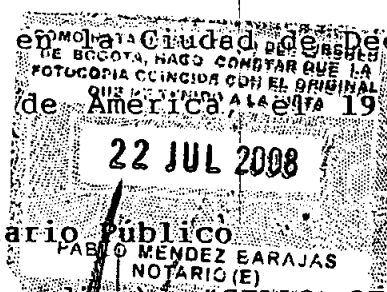
TRADUCCION OFICIAL No. 8.90.93 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un Poder escrito en inglés y español otorgado por la sociedad **BAXTER INTERNATIONAL INC.**, a favor de los Doctores **GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO Y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**).

Dado y firmado hoy 16 de junio de 1993, en Deerfield, Illinois, Estados Unidos de América, por el señor **A. GERARD SIECK, ASSISTANT SECRETARY**

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia y representación de la sociedad **BAXTER INTERNATIONAL INC.**, expedido en la Ciudad de Deerfield, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, el 19 de octubre de 1993.

(Firmado), **Mary H. Cross, Notario Público**
(Sello Notarial en tinta que dice) **"SELLO OFICIAL"**
Mary Cross, Notario Público, Estado de Illinois Mi Comisión Expira 6/26/94



CERTIFICACION

LINDA IANUZI HESS

15

ESCRIBANO DEL CONDADO LAKE

18 NORTH COUNTY STREET

WAUKEGAN, ILLINOIS 60085

Servicios Generales 708/360-3610 * Elecciones 708/360-6628 *

Prórrogas y Redenciones de Impuestos 708/360-6657

ESTADO DE ILLINOIS)

) SS

CONDADO DE LAKE)

CERIFICADO DE AUTORIDAD

Yo, Linda Ianuzi Hess, Escribano de Condado del condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que **Mary H. Cross** quien ha notarizado el documento anterior o adjunto, era el 26 de junio de 1990, **Notario Público** nombrado en y para el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy junio 17 de 1993.

(Firmado): LINDA IANUZI HESS

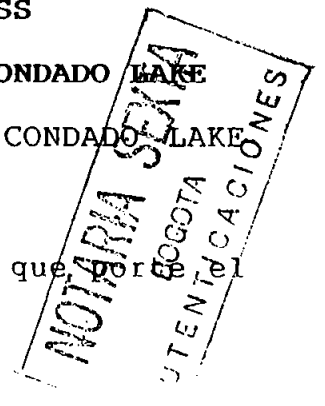
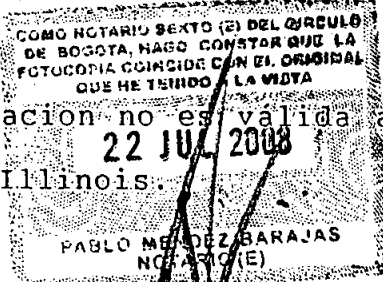
ESCRIBANO DEL CONDADO LAKE

(Sello seco en relieve que dice): SELLO OFICIAL CONDADO LAKE ILLINOIS

(Impreso): Esta certificación no es válida a menos que porte el sello del Condado Lake, Illinois.

(Impreso): 113-208 12/89

(En español): Legalización de la firma que antecede hecha por el **CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS**, bajo el No. 1610/93, de fecha junio 29 de 1993, firmada por la señora María Teresa González, Encargada de Funciones Consulares.



16

Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiun dólares.

(Sello Consular en tinta que dice): CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA * CHICAGO *

Legalización de la firma que antecede hecha por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA bajo el No. 481652 de fecha 5 de agosto de 1993, firmada por el señor Nelson Sánchez Torres, Jefe Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, agosto 9 de 1993

COLO 5873-702-001-4

BRM-27

Bernarda R. de Martínez

Bernarda R. de Martínez

Traductora e Intérprete Oficial

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO DE BOGOTA, NADA RESOLUTIVO 683 de 1994
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

22 JUL 2008

NOTARIA SEXTA
BOGOTA
AUTENTICACIONES

No. 487876
MINISTERIO RELACIONES EXTERIORES
AREA DE NEGOCIOS GENERALES
HACE CONSTAR
Que el señor *Nelson Sánchez Torres*
Cuya firma aparece al pie del presente documento, desempeñaba en esa fecha las funciones allí indicadas.
Santafé de Bogotá, D. C., 12 AGO. 1993

El suscrito Jefe de Legalizaciones no asume responsabilidad alguna por el contenido de este documento.

Nelson Sánchez Torres
Jefe de Legalizaciones

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO DE BOGOTA, NADA RESOLUTIVO 683 de 1994
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
DOCUMENTO POR *Nelson Sánchez Torres*
C. C. No. *12 AGO. 1993*
con la registrada en esta Notaría
SANTAFE DE BOGOTA D. C.
coincide

NOTARIA SEXTA
BOGOTA
AUTENTICACIONES

10 AGO. 1993

17

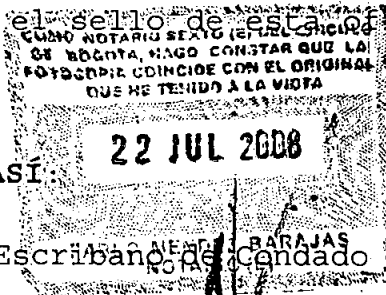
TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.03/00 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

MODIFICACIÓN A LA TRADUCCIÓN OFICIAL No. 8.90.93. REALIZADA POR BERNARDA R. DE MARTÍNEZ CON FECHA 9 DE AGOSTO DE 1993.

Se modifica específicamente lo que se subraya en la siguiente transcripción de la parte de la traducción que corresponde al CERTIFICADO DE AUTORIDAD otorgado por el Escribano del Condado de Lake, la cual dice así: "Yo, Linda Ianuzzi Hess, Escribano de Condado del Condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que Mary H. Cross quien ha notariado el documento anterior o adjunto, era el 26 de junio de 1990, Notario Público nombrado en y para todo el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual, he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy junio 17 de 1993".

PARA QUE AHORA SE LEA ASÍ:

Yo, Linda Ianuzzi Hess, Escribano del Condado del Condado de Lake en el Estado de Illinois, cuya oficina es una oficina de registro que tiene un sello, certifico que Mary H. Cross, quien ha notariado el documento anterior o adjunto, fue nombrada el 26 de junio de 1990 un Notario Público en y para todo el Condado de Lake, Estado de Illinois y como tal, a todas sus certificaciones deben ser reconocidas. En testimonio de lo cual, he firmado y estampado el sello de esta oficina hoy junio 17 de 1993.



18

(Al dorso) Legalización de la firma que antecede expedida por el
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 481652 del 5 de
agosto de 1993, firmada por el Jefe de Legalizaciones.

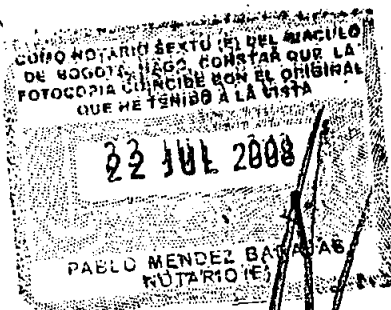
Es traducción fiel de la cual se deja copia en esta oficina para
su confrontación.

COLO WPCL 5873-702-001-4

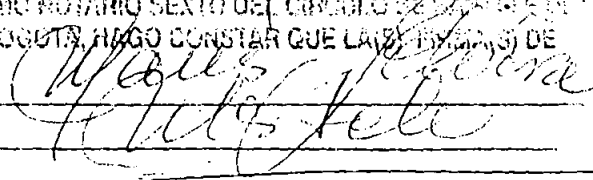
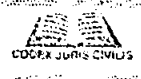
MAR.13/00

Maria Elvira Martelo
TRADUCCION No.: 0803/00
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
233930
ELVIRA MARTELO
LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DE SEMPRENA
CON LAS INICIALES INDICADAS



2000 MAR 14 AM 11:58
DE LEGALIZACIONES
SANTAFÉ DE BOGOTÁ

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE NOTARIAS DE
 BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRM(A)S DE

 COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
 EL(ELLOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTIAGO DE BOGOTA, **14 MAR. 2007**


NOTARIA SEXTA
 ABLO MENDEZ
 BARAJAS
 Sexto Sexo En Cargo

EXTENSION 2
 SERVICIO DE REGISTRO

3030

SERVICIO DE REGISTRO
 EXTENSION 2

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
 DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
 FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
 QUE HE TENIDO A LA VISTA
22 JUL 2008
 ABLO MENDEZ BARAJAS
 NOTARIO (E)

62 JUL 10 A 11:29
 SERVICIO DE REGISTRO

SERVICIO DE REGISTRO
 EXTENSION 2

19

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª, No. 72-35

BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFAX (57) (1) 2358850

TELEX: 45479 CAVE CO
(231740) 375 CAVE UC

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE

TELEFONO (57) (1) 2120100

CABLES: CAVELEYES

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BAXTER INTERNATIONAL INC.

Poder conferido el: 16-06-93

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder conferido en el doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,

Acepto:


GERMAN CAVELIER
T.P.A. No. 31.929
C.C. No. 438.019 de Bogotá
22 JUL 2008
EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929
C.C. No. 438.019 de Usaquén

2e-780-2

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

INTERVENCIÓN Y PRESENTACIÓN PERSONAL

07 ABR 1994

.....
.....
.....
.....
.....

que
.....
.....

y la(s)
.....

domiciliado(s) en
.....
.....
En constancia se firma esta diligencia.

COMO NOTARIO SEXTO (S) DEL CIRCULO
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
22 JUL 2008
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

NOTARIA SEXTA
BOGOTÁ
AUTENTICACIONES

.....





SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by KIMBERLY R BARDWELL

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY

4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Chicago, Illinois

6. JUNE 4, 2008

7. by the Secretary of State, State of Illinois

8. No. C08DB15190

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS

21

AFFIDAVIT OF SUSANNE L. GRANT

I, Susanne L. Grant, having been duly sworn, depose and state as follows:

1. I am employed as a paralegal by Baxter Healthcare Corporation. ("Baxter").
2. I have personally reviewed the original Assignments listing the inventors of record from Baxter International Inc. and National Institute for Biological Standards and Control.
3. The photocopies attached hereto are true and accurate reproductions of the original Assignments.

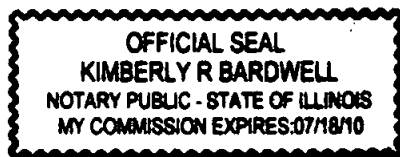
FURTHER AFFIANT SAYETH NOT.

Date: June 3, 2008 By: Susanne L. Grant
Susanne L. Grant

BAXTER HEALTHCARE CORPORATION
One Baxter Parkway DF2-2W
Deerfield, Illinois 60015

On this 3rd day of June, 2008, before me, a Notary Public, appeared Susanne L. Grant, to me personally known to be the person signing this Affidavit, who, being duly sworn, deposes and states that she is the person whose signature appears above and she attests to the fact that the statements made above are true and complete to the best of her knowledge and belief.

Seal:



Kimberly R. Bardwell
Notary Public

Serial No. 60/752,970Filed December 22, 2005Docket No. CPTR-6206-PRO

In consideration of good and valuable considerations, the receipt and sufficiency whereof are hereby acknowledged, I hereby assign to **BAXTER INTERNATIONAL INC.**, a corporation of Delaware, having a principal place of business at Deerfield, Illinois, its successors, legal representatives and assigns, and **BAXTER HEALTHCARE S.A.**, a corporation of Switzerland, having a principal place of business at Zurich, Switzerland, its successors, legal representatives and assigns (hereinafter jointly referred to as "ASSIGNEE") the entire right, title and interest throughout the world in our invention or improvements in

**IMPROVED MONOCYTE ACTIVATION TEST BETTER ABLE TO DETECT NON-
ENDOTOXIN PYROGENIC CONTAMINANTS IN MEDICAL PRODUCTS**

and in the application for Letters Patent of the United States therefor, executed by me on or before the date(s) indicated below and any and all other United States applications and applications in any and all countries which I may file, either solely or jointly with others, on said invention or improvements, and in any and all Letters Patent of the United States or of any other country which may be obtained on any of the said applications, and in any reissue or extension thereof.

I hereby authorize and request the Commissioner of patents to issue said Letters Patent to said ASSIGNEE.

I hereby authorize and request the attorneys of record in said application to insert in this assignment the date and serial number of said application when officially known.

I warrant myself to be the owners of the interest herein assigned and to have the right to make this assignment; and further warrant that there are no outstanding prior assignments, licenses, or other rights in the interest herein assigned.

For said considerations I hereby agree, upon the request and at the expense of said assignee, its successors, legal representatives and assigns, to execute any and all divisional, continuation, and renewal applications for said invention or improvements, and any necessary oath or supplemental oath or affidavit relating thereto, and any application for the reissue or extension of any Letters Patent that may be granted upon said application that said assignee, its successors, legal representatives and assigns may deem necessary or expedient, and for the said considerations I further agree, upon the request of said assignee, its successors, legal representatives and assigns, in the event of said application or any division thereof, or Letters Patent issued thereon, or any reissue or application for the reissue thereof becoming involved in interference, to cooperate to the best of our ability with said assignee, its successors, legal representatives and assigns in the matters of preparing and executing the preliminary statement and giving and producing evidence in support thereof. I further agree to perform, upon such request, any and all affirmative acts to obtain Letters Patent, and vest all rights therein hereby conveyed in the said assignee, its successors, legal representatives and assigns whereby said Letters Patent will be held and enjoyed by the said assignee, its successors, legal representatives and assigns to the end of the term for which said Letters Patent may be granted as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me if this assignment and sale had not been made, and for the said considerations I hereby also assign to said assignee, its successors, legal representatives and assigns the entire right, title and interest in said invention or improvements for any and all foreign countries and the right of priority for patent and utility model applications in all countries arising under any applicable international convention for the protection of industrial property and/or any internal priority legislation of such countries, and I further agree upon the request of said assignee, its successors, legal representatives and assigns to execute any and all documents that shall be required to be executed in connection with any and all applications for foreign Letters Patent therefor, including the prosecution thereof, and to execute any and all documents necessary to invest title in said foreign applications and patents in said assignee.

WITNESS my hand and seal

Date 1/26/06 Signature Mehul Patel

Typed Name: Mehul Patel

State of Colorado, County of Boulder

Signed before me on this 26 day of January, 20 06

By Mehul Patel

Inventor

Wesley Shepherd
Notary Public

Commission expires 2/24/08



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MARCH 17, 2006

PTAS

500085663A

~~*500085663A*~~

KATHLEEN M. PETRILLO / *mxs*
ONE METROPOLITAN SQUARE
16TH FLOOR
ST. LOUIS, MO 63102

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 03/16/2006

REEL/FRAME: 017319/0555
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: BXTR 25002 /

ASSIGNOR:

✓ PATEL, MEHUL

✓ DOC DATE: 01/26/2006

ASSIGNEE:

✓ BAXTER INTERNATIONAL INC.
ONE BAXTER PARKWAY
DEERFIELD, ILLINOIS 60015

ASSIGNEE:

✓ BAXTER HEALTHCARE S.A.
HERTISTRASSE 2
WALLISELLEN, KANTON
ZURICH, SWITZERLAND CH-8304

017319/0555 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 60752970

FILING DATE: 12/22/2005

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: MONOCYTE ACTIVATION TEST BETTER ABLE TO DETECT NON-ENDOTOXIN
PYROGENIC CONTAMINANTS IN MEDICAL PRODUCTS

MARGARET LASALLE, PARALEGAL
ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MARCH 15, 2006

PTAS

500085422A

500085422A

KATHLEEN M. PETRILLO /AXS
ONE METROPOLITAN SQUARE
16TH FLOOR
ST. LOUIS, MO 63102

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 03/15/2006

REEL/FRAME: 017310/0672
NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: BXTR 25002

ASSIGNOR:
POOLE, STEPHEN

DOC DATE: 03/03/2006

ASSIGNEE:
NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL
STANDARDS AND CONTROL
BLANCHE LANE
SOUTH MIMMS
POTTERS BAR, UNITED KINGDOM EN6 3QG

SERIAL NUMBER: 60752970

FILING DATE: 12/22/2005

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: MONOCYTE ACTIVATION TEST BETTER ABLE TO DETECT NON-ENDOTOXIN
PYROGENIC CONTAMINANTS IN MEDICAL PRODUCTS

017310/0672 PAGE 2

ANTIONE ROYALL, EXAMINER
ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

26

25

ASSIGNMENT

WHEREAS, I, Stephen Poole of London, England have invented an improvement in (IMPROVED MONOCYTE ACTIVATION TEST BETTER ABLE TO DETECT NON-ENDOTOXIN PYROGENIC CONTAMINANTS IN MEDICAL PRODUCTS CPTR-6206-PRO; Our File BXTR 25002) and have executed an application for a United States patent based thereon assigned Serial No. 60/752,970, filed December 22, 2005;

AND, WHEREAS, the National Biological Standards Board of Herts, England, a corporation of the United Kingdom (hereinafter referred to as "ASSIGNEE"), is desirous of acquiring certain rights thereunder;

NOW, THEREFORE, for one dollar and other good and valuable consideration, receipt of all of which is hereby acknowledged, I have agreed to and do hereby sell, assign, and transfer unto said ASSIGNEE the entire right, title, and interest in and throughout the United States of America (including its territories and dependencies) and all countries foreign thereto in and to said invention, said United States application, any other United States applications (including provisional, non-provisional, divisional, continuing, or reissue applications) based in whole or in part on said United States application or in whole or in part on said invention, any foreign applications based in whole or in part on any of the aforesaid United States applications or in whole or in part on said invention, and any and all patents (including extensions thereof) of any country which have been or may be granted on any of the aforesaid applications or on said invention or any part thereof;

28

TO BE HELD AND ENJOYED by said ASSIGNEE, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by me had no sale and assignment of said interest been made;

AND I hereby authorize and request the Commissioner of Patents of the United States of America to issue any and all United States patents which may be granted upon said United States applications or any of them, or upon said invention or any part thereof, to said ASSIGNEE;

AND I hereby agree for myself and for my heirs, executors and administrators, to execute without further consideration any further lawful documents and any further assurances, and any provisional, non-provisional, divisional, continuing, reissue, or other applications for patents of any country, that may be deemed necessary by said ASSIGNEE fully to secure to said ASSIGNEE its interest as aforesaid in and to said invention or any part thereof, and in and to said several patents or any of them;

AND I hereby covenant for myself and my legal representatives, and agree with said ASSIGNEE, its successors and assigns, that I have granted no right or license to make, use or sell said invention, to anyone except said ASSIGNEE, that prior to the execution of this deed my right, title, and interest in said invention had not been otherwise encumbered, and that I have not executed and will not execute any instrument in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand.

3rd March 2006

Date

Stephen Poole
Stephen Poole

(DR. A. F. BRISTOW)

Witness


Blanche Lane
South Mimms
Potters Bar
Hertfordshire EN6 3QG
United Kingdom
Telephone 01707 654753
Fax 01707 646730

TRADUCCIÓN OFICIAL 170/2008 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES
REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 DEL
MINISTERIO DE JUSTICIA Y REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA.

DECLARACIÓN JURADA DE SUSANNE L GRANT

Yo, Susanne L. Grant, después de haberme juramentado
debidamente por la presente declaro y afirmo lo siguiente:

1. Trabajo como asistente jurídico (paralegal) para BAXTER
HEALTHCARE CORPORATION ("Baxter").
2. He revisado personalmente las cesiones originales que
enumeran los inventores registrados de Baxter
Internacional Inc. y Nacional Institute for Biological
Standards and Control.
3. Las fotocopias adjuntas son reproducciones verídicas y
exactas de las cesiones originales

NO TENGO NADA MAS QUE DECIR

Fecha 3 de junio de 2008 . Por Susanne L. Grant.

BAXTER HEALTHCARE CORPORATION

ONE BAXTER PARKWAY DF2-2W

DEERFIELD, ILLINOIS 60015

Hoy 3 de junio de 2008, ante mi, notario público,
compareció SUSANNE L GRANT, conocido mío personalmente
como el individuo cuya firma aparece arriba y ella
certifica el hecho de que las declaraciones hechas arriba
Son verídicas y completas a mi leal saber y entender.

Firmado: KIMBERLY P Bardwell

SELLO: SELLO OFICIAL

KIMBERLY R. BARDWELL, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE ILLINOIS.

MI CARGO VENCE EL 18 DE JULIO DE 2010.

CESION

(INVENTOR ÚNICO)

NÚMERO DE SERIE 60/752,970. PRESENTADA EL 22 DE DICIEMBRE DE 2006. EXPEDIENTE CPTR-6206-PRO

A cambio de compensaciones adecuadas y valiosas de las cuales se acusa recibo y prueba de suficiencia, por la presente cedo a BAXTER INTERNATIONAL INC., una empresa de Delaware, con sede principal de negocios en Deerfield, Illinois, sus sucesores, representantes legales y cesionarios y a BAXTER HEALTHCARE S.A., una sociedad de Suiza, con sede principal de negocios en Zurich, Suiza, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, (que a continuación conjuntamente llamaremos el "CESIONARIO") todo el derecho, título e interés en todo el mundo sobre nuestra invención o mejoras en PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOLITO MEJORADA PARA TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS y sobre la solicitud de patente en Los Estados Unidos con respecto a dicho invento, firmada por mí en o antes de la fecha indicada más adelante y sobre todas y cada una de las solicitudes estadounidenses y de otros países que yo pueda presentar, ya sea en forma única o conjuntamente con otros, sobre dicho invento o mejoras, y en todas y cada una de las patentes de Estados Unidos o de cualquier otro país que puedan obtenerse sobre cualesquiera de dichas solicitudes y sobre cualquier segunda publicación o ampliaciones del mismo.

Por la presente autorizo y solicito al comisionado de patentes que expida dichas patentes a dicho CESIONARIO.

32

Por la presente autorizo y solicito a los abogados respectivos en dichas solicitudes insertar en esta cesión la fecha y número de serie de dicha solicitud cuando se sepa oficialmente.

Garantizo ser el propietario del interés aquí cedido y tener el derecho a realizar esta cesión y además que no hay cesiones previas o licencias u otros derechos pendientes sobre el interés aquí cedido.

Para dichas compensaciones acuerdo, cuando se solicite y por cuenta de dicho cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, nombrar todas las solicitudes divisionales, continuaciones y solicitudes de renovación por dicho invento o mejoras y tomar cualquier juramento o juramento suplementario o declaración juramentada relacionada, y sobre cualquier solicitud para la segunda publicación o ampliación de alguna patente que pueda ser otorgada sobre dicha solicitud y que dicho cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios puedan considerar necesarias o convenientes, y para dichas compensaciones además acuerdo, cuando lo soliciten dichos cesionarios, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, en caso de que dicha solicitud o alguna división de la misma, o patente expedida sobre la misma, o cualquier segunda publicación o solicitud de segunda publicación se relacione con alguna interferencia, cooperar hasta el máximo con dicho cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios en los asuntos relativos a la preparación y firma de la declaración preliminar y en la entrega de pruebas en apoyo de la misma. Además acuerdo realizar, con

33

base en dicha solicitud, cualquier acto afirmativo para obtener patentes, y otorgar todos los derechos allí transferidos a dicho cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, cuando dicha patente esté a nombre y la disfrute dicho cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios hasta el final del período para el cual dicha patente se pueda otorgar en forma tan completa y entera como si la misma hubiera sido de propiedad y disfrutada por mí si dicha cesión y venta no se hubieran hecho, y a cambio de dichas compensaciones también cedo a dicho cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios todo el derecho, título e interés sobre dicho invento o mejoras en todos los países extranjeros y el derecho de prioridad sobre solicitudes de patente y de modelos de utilidad en todos los países que surgieren de bajo cualquier convención internacional aplicable a la protección de la propiedad industrial y o cualquier legislación interna prioritaria de dichos países, y además acuerdo que cuando lo solicite dicho cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, firmar todos los documentos que se requieran firmar en relación con cualquier solicitud de patente por este invento, incluyendo la tramitación de la misma, y firmar todo documento que sea necesario para conceder el título sobre dicha solicitud extranjera y patente a dicho cesionario.

Atestiguo mediante mi firma y sello

Fecha 26 de enero de 2006. Firma ilegible

Nombre mecanografiado: MEHUL PATEL. Estado de Colorado, condado de Boulder. Firmado ante mi hoy 26 de enero de 2006, por MEHUL PATEL, inventor.

FIRMA ILEGIBLE: NOTARIO PÚBLICO

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

SUBSECRETARIA DE COMERCIO PARA PROPIEDAD INTELECTUAL Y DIRECTOR DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE ESTADOS UNIDOS.

17 de marzo de 2006

500085663 A

KATHLEEN M PETRILLO

ONE METROPOLITAN SQUARE

16TH FLOOR

ST. LOUIS MO 63102

Oficina de marcas y patentes de Estados Unidos

Nota de registro de documento de cesión

El documento adjunto ha sido registrado por la división de cesiones de la Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos. Una copia microfilmada completa está disponible en el salón de búsqueda de cesiones en el carrito y cuadro informado más abajo.

Sirvase revisar toda la información contenida en esta notificación. La información contenida en esta nota de registro refleja los datos presentes en el sistema de cesión de marcas y patentes. Si encuentra errores o tiene alguna duda con respecto a esta notificación, puede contactar al empleado cuyo nombre aparece en esta notificación en el número 571-272-3350. Sirvase enviar una solicitud de corrección a US. PATENT AND TRADEMARK OFFICE,

MAIL STOP: SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESION, P.O. BOX 1450,
ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO 16 DE MARZO DE 2006. CARRETE, CUADRO
017319/0555. NÚMERO DE PAGINAS 3

MEMORIAL: CESION DE INTERES DEL CEDENTE (VER DOCUMENTO
PARA DETALLES) EXPEDIENTE NUMERO BXTR 25002

CEDENTE: PATEL MEHUL. FECHA DE DOCUMENTO 26 DE ENERO DE
2006

CESIONARIO: BAXTER INTERNACIONAL INC.

ONE BAXTER PARKWAY

DEERFIELD, ILLINOIS, 60015

CESIONARIO: BAXTER HEALTHCARE S.A

ERTISTRASSE 2

WALLISELLEN, KANTON

ZURICH, SWITZERLAND CH-8304

NÚMERO DE SERIE 60752970

FECHA DE RADICACIÓN 22 DE DICIEMBRE DE 2005

TÍTULO: PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOLITO MEJORADA PARA
TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES
PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS

FIRMADO: MARGARET LASALLE, ASISTENTE JURÍDICO (PARALEGAL)

SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESIÓN

DIVISION DE REGISTROS PÚBLICOS

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

SUBSECRETARIA DE COMERCIO PARA PROPIEDAD INTELECTUAL Y
DIRECTOR DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE ESTADOS
UNIDOS.

15 de marzo de 2006

500085422 A

BLANCHE LANE, SOUTH MIMMS, POTTERS BAR, REINO UNIDO EN6
3QG

NÚMERO DE SERIE 60752970. FECHA DE RADICACIÓN 22 DE
DICIEMBRE DE 2005.

TÍTULO: PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOLITO MEJORADA PARA
TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES
PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS

ANTIONE ROYALL, EXAMINADOR

SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESION

DIVISION DE REGISTROS PÚBLICOS

CESION

CONSIDERANDO QUE YO, Stephen Poole de Londres, Inglaterra he
inventado una mejora en (PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOLITO
MEJORADA PARA TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR
CONTAMINANTES PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS
CPTR-6206-PRO; NUESTRO EXPEDIENTE BXTR 25002) Y HE FIRMADO
UNA SOLICITUD DE PATENTE ESTADOUNIDENSE CON BASE EN ELLA A LA
QUE SE ASIGNÓ EL NÚMERO DE SERIE 60/752,972, PRESENTADA EL 22
DE DICIEMBRE DE 2005

Y CONSIDERANDO QUE , LA JUNTA DE NORMAS BIOLOGICAS NACIONALES
DE HERTS, INGLATERRA, UNA SOCIEDAD DEL REINO UNIDO (QUE
ACONTINUACIÓN LLAMAREMOS EL CESIONARIO), DESEA ADQUIRIR
CIERTOS DERECHOS BAJO LA MISMA

POR LO TANTO, A CAMBIO DE UN DÓLAR Y OTRA COMPENSACIÓN
ADECUADA Y VALIOSA, DE LA CUAL POR LA PRESENTE ACUSO RECIBO,
HE ACORDADO Y POR EL PRESENTE VENDO, CEDO Y TRANSFIERO A
DICHOS CESIONARIO TODO EL DERECHO, TÍTULO E INTERÉS EN LOS
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA (INCLUYENDO SUS TERRITORIOS Y

DEPENDENCIAS) Y EN TODOS LOS PAÍSES EXTRANJEROS SOBRE DICHA INVENCION, DICHA SOLICITUD ESTADOUNIDENSE, CUALQUIER OTRA SOLICITUD ESTADOUNIDENSE (INCLUYENDO SOLICITUDES PROVISIONALES, NO PROVISIONALES, DIVISIONALES, CONTINUACIONES O SEGUNDAS PUBLICACIONES) CON BASE EN TODO O EN PARTE EN DICHA INVENCION, CUALQUIER SOLICITUD EXTRANJERA CON BASE EN TODO O EN PARTE EN CUALQUIERA SOLICITUD EXTRANJERA CON BASE EN TODO O EN PARTE SOBRE DICHO INVENTO, Y SOBRE TODAS LAS PATENTES (INCLUYENDO AMPLIACIONES DE LA MISMA) DE CUALQUIER PAIS QUE HAYAN SIDO O PUEDAN SER OTORGADAS SOBRE CUALQUIERA DE DICHAS SOLICITUDES O SOBRE DICHA INVENCION O PARTE DE LA MISMA;

PARA CONVERTIRSE EN POSESION Y PARA EL GOCE DE DICHO CESIONARIO,, SUS SUCESOES Y CESIONARIOS, EN FORMA TAN ENTERA Y COMPLETA COMO SI LA MISMA HUBIERA SIDO POSEIDA Y DISFRUTADA POR MI SI NO SE HUBIERA REALIZADO VENTA O CESION SOBRE DICHO INTERES

Y POR EL PRESENTE AUTORIZO Y SOLICITO AL COMISIONADO DE PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA EXPEDIR TODAS Y CADA UNA DE LAS PATENTES ESTADOUNIDENSES QUE PUEDAN SER OTORGADAS CON BASE EN DICHAS SOLICITUDES DE PATENTE O CUALESQUIERA DE ELLAS, O CON BASE EN DICHO INVENTO O CUALQUIER PARTE DEL MISMO, A DICHO CESIONARIO

Y POR EL PRESENTE ACUERDO A NOMBRE MIO Y DE MIS HEREDEROS Y ALBACEAS, FIRMAR SIN COMPENSACION ADICIONAL CUALQUIER DOCUMENTO JURIDICO ADICIONAL Y SEGURIDADES ADICIONALES, Y CUALQUIER SOLICITUD PROVISIONAL, NO PROVISIONAL, DIVISIONAL, CONTINUACION, SEGUNDA PUBLICACION U OTRAS SOLICITUDES DE PATENTE EN CUALQUIER PAIS, QUE PUEDAN CONSIDERARSE NECESARIAS POR DICHO CESIONARIO COMPLETAMENTE PARA ASEGURAR A DICHO

CESIONARIO SU INTERES SOBRE DICHO INVENTO O CUALQUIER PARTE DEL MISMO, Y SOBRE DICHAS PATENTES VARIAS O CUALESQUIERA DE ELLAS;

ADEMAS, ACUERDO A NOMBRE MIO Y DE MIS REPRESENTANTES LEGALES, Y CON DICHO CESIONARIO, SUS SUCESTORES Y CESIONARIOS, QUE NO HE OTORGADO DERECHO O LICENCIA PARA HACER, USAR O VENDER DICHO INVENTO, A NINGUNA PERSONA DIFERENTE A DICHO CESIONARIO, Y QUE ANTES DE LA FIRMA DE ESTE DOCUMENTO MI DERECHO, TITULO E INTERES SOBRE DICHO INVENTO NO HABIAN SIDO DE OTRA FORMA AFECTADOS, Y QUE NO HE FIRMADO Y NO FIRMARÉ NINGÚN INSTRUMENTO QUE ENTRE EN CONFLICTO CON EL PRESENTE.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, HE FIRMADO. 3 DE MARZO DE 2006.

FIRMADO: STEPHEN POOLE.

FIRMA ILEGIBLE, TESTIGO

NIBSC, BLANCHE LANE, SOUTH MIMMS POTTERS BAR, HERTFORDSHIRE
EN6 3QG, REINO UNIDO.

ESTADO DE ILLINOIS

SECRETARIA DE ESTADO

SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

ESTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR KIMBERLY R. BARDWELL

3. QUIEN ACTUA EN CALIDAD DE NOTARIO PÚBLICO, CONDADO LAKE

4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DEL ESTADO DE ILLINOIS

CERTIFICADO

5. EN CHICAGO, ILLINOIS

6. 4 DE JUNIO DE 2008

7. POR EL SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE ILLINOIS

8. NO. C08DB15190

9. SELLO/ESTAMPILLA: SELLO DEL ESTADO DE ILLINOIS, 26 DE AGOSTO DE 1818.

10. FIRMA: JESSE WHITE, SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE ILLINOIS.

ECN\ECN\ID-130054\WPCL002G

COLO-16577-841-001-0

Bogotá, Colombia, 9 de julio de 2008.

Eduardo Calado

Eduardo Calado Jarama
TRADUCCION OFICIAL
INGLES - ESPAÑOL - COLOMBIANO
Res. 541 Febrero de 1970

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

788643

Eduardo Calado
AUTENTICACION DEL TEXTO
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2008 JUL 10 P 12:06

Calado
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

41

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
5 July 2007 (05.07.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/076411 A1

(51) International Patent Classification:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/062424

(22) International Filing Date:
20 December 2006 (20.12.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/752,970 22 December 2005 (22.12.2005) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **BAXTER INTERNATIONAL INC.** [US/US]; One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015 (US). **BAXTER HEALTHCARE S.A.** [CH/CH]; Hertistrasse 2, Wallisellen, Kanton, CH-8304 Zurich (CH). **NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD** [GB/GB]; Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **POOLE, Stephen** [GB/GB]; 72 Grasmere Avenue, London SW19 3DX (GB). **PATEL, Mehul** [US/US]; 2821 Shoshone Trl, Lafayette, Colorado 80026 (US).

(74) Agent: **PETRILLO, Kathleen, M.**; Senniger Powers, 1 Metropolitan Square, 16th Floor, St. Louis, MO 63102, (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMPROVED MONOCYTE ACTIVATION TEST BETTER ABLE TO DETECT NON-ENDOTOXIN PYROGENIC CONTAMINANTS IN MEDICAL PRODUCTS

(57) Abstract: An improved monocyte activation test is described that is better able to detect non-endotoxin pyrogens in medical products, in which a sample is incubated with a monocyte-containing reagent in an assay system comprising at least one surface comprising polypropylene. The invention also concerns assay systems for use in these tests that include at least one microtiter well having at least one interior surface comprising polypropylene and having a shape such that monocyte-containing reagent is concentrated in the well to provide greater cell to cell contact. The invention also relates to a diagnostic kit that can be used to test for the presence of non-endotoxin pyrogens in a sample.



WO 2007/076411 A1

IMPROVED MONOCYTE ACTIVATION TEST BETTER ABLE TO DETECT NON-ENDOTOXIN PYROGENIC CONTAMINANTS IN MEDICAL PRODUCTS

FIELD OF INVENTION

[0001] The present invention generally concerns an improved monocyte activation test that is better able to detect non-endotoxin pyrogens in medical products, in which a sample is incubated with a monocyte-containing reagent in an assay system comprising at least one surface comprising polypropylene. The invention also concerns assay systems for use in these tests that include at least one microtiter well having at least one interior surface comprising polypropylene and having a shape such that monocyte-containing reagent is concentrated in the well to provide greater cell to cell contact. The invention also relates to a diagnostic kit that can be used to test for the presence of non-endotoxin pyrogens in a sample.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] When certain chemical or biological compounds are brought into contact with the circulatory system of humans or other mammals, they cause a systemic response known as the inflammatory response or inflammation. The inflammatory response is a defense mechanism to protect the body from infection and/or injury; inflammation increases blood flow to the site of infection or injury, bringing necessary fluids, proteins, and white blood cells (leukocytes) to help in the healing process. For example, one symptom associated with the inflammatory response is an elevation in body temperature or fever, which functions as a defense mechanism to pathogens that cause overheating. The inflammatory response may be associated with a variety of "flu-like" symptoms including fever, chills, fatigue, headaches, loss of appetite, and muscle stiffness. A chemical or biological compound that triggers fever has historically been referred to as a "pyrogen" or a "pyrogenic" compound, referring to the fever response which such compounds may cause. Some chemical or biological compounds, however, are generally pro-inflammatory and may or may not cause fever as part of the inflammatory response that they cause.

[0003] In some cases, depending on the sensitivity of an individual and the type and concentration of pyrogen the individual is exposed to, an individual can develop life-threatening shock-like symptoms after exposure to a pyrogen. Medical products which can be inhaled, injected, or infused and medical devices such as membranes or implanted materials pose a particular risk of pyrogenicity. Even nutrients can represent a risk of pyrogenicity. Pyrogens contained in medical

products and nutrients are referred to as *exogenous* pyrogens; in contrast, *endogenous* pyrogens are messenger compounds of the immune system that mediate an individual's inflammatory response to *exogenous* pyrogens. In addition to the pyrogenic nature of a product itself or by-products of its production, contamination of the product can often cause pyrogenicity. Pyrogenicity due to contamination of a product can be caused by any one of a diverse group of pyrogens derived from bacteria, viruses, fungi, or even from the host. This problem can persist even if the product is "sterilized" by heat or chemical methods; a commonly encountered pyrogenic compound, bacterial endotoxin (consisting largely of lipopolysaccharide (LPS) from the cell wall of Gram-negative bacteria), can remain after the bacteria are killed. Thus, pyrogen testing of various pharmaceuticals, nutrients, and medical products for parenteral application is necessary in order to ensure the safety of such products.

[0004] Usually, compounds which act as a pyrogen do so by stimulating the production of endogenous pyrogens, such as prostaglandins and proinflammatory cytokines, in monocytes after contact with tissue, cells, or body fluids. It is these endogenously produced pyrogens which mediate the inflammatory response in the affected organism. The most important and well-known of these endogenous pyrogens are the cytokines interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor (TNF) and the low molecular weight lipid mediator prostaglandin E₂ (PGE₂). These compounds are routinely assayed by ELISA, or enzyme-linked immunosorbent assays (for IL-1, IL-6, or TNF), and EIA, or enzyme immunoassay (for PGE₂).

[0005] In order to avoid a pyrogenic reaction and ensure the safety of any drug or pharmaceutical product administered parenterally, pyrogenic contamination must be monitored to identify individual lots that are contaminated with bacterial contaminants. Two animal-based Pharmacopial methods, the Limulus amoebocyte lysate (LAL) test, also referred to as the bacterial endotoxins test (BET), and the rabbit pyrogen test, are currently routinely used to monitor pyrogen contamination in mass-produced pharmaceutical products.

[0006] The rabbit test is an in-vivo test which consists of injecting a statistically significant number of rabbits with the sample compound and observing the average rise in body temperature elicited in the test animals. Although the rabbit test is responsive to a wide spectrum of pyrogenic agents, including non-endotoxin pyrogens, the rabbit test has a relatively low sensitivity (ng endotoxin/ml) compared to other pyrogen tests (pg endotoxin/ml for the LAL test). In addition, the correlation

of pyrogenic responses to compounds between species is, at best, approximate. It has been documented, for instance, that the dose of bacterial endotoxin eliciting a pyrogenic response varies as much as 10,000 fold between species. The relative insensitivity, poor quantitative results, variability between rabbit species, and ethical issues involved in animal testing have made the rabbit test disfavored in recent years.

[0007] In contrast to the rabbit test, which detects a wide range of pyrogens, the LAL test only detects endotoxin pyrogens. Bacterial endotoxin, e.g., lipopolysaccharide (LPS), which comes from the cell wall of Gram-negative bacteria, is one of the best described pyrogenic compounds (Moltz et al., Neurosci. Biobehav. Rev., 1993, 17, 237-269; Tilders et al., Psychoneuroendocrinology, 1994, 19, 209-232; Rothwell, Crit. Rev. Neurobiol., 1994, 8, 1-10; Zeisberger and Roth, Neuropsychobiology, 1993, 28, 106-109). It was therefore thought to be generally useful to replace expensive and time consuming rabbit experiments with a direct LAL test for bacterial endotoxin. This approach has obvious limitations. The LAL test is a very sensitive in-vitro test; however, it only detects endotoxins from Gram-negative bacteria and gives false negative results with certain products which can still stimulate monocytes to make pyrogenic cytokines. The LAL test is also susceptible to interference by, for example, high protein levels of test substances or by glucans (Roslansky and Novitsky, J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 2477; Fennrich et al., Dev. Biol. Stand., 1999, 101, 131). On the other hand, the Limulus test is so sensitive that it is easily prone to false positive results due to impurities that are not relevant to product quality (Fujiwara et al., Yakugaku Zasshi, 1990, 110, 332-340).

[0008] Thus, a need existed for a non-animal-based test system that is characterized by high sensitivity, high specificity, and the ability to detect a wide range of pyrogens. With this intent and with an improved understanding of the human inflammatory response, test systems based on the in vitro activation of human monocytes were developed. Some 20 years ago, researchers used peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to detect endotoxin by monitoring the release of pyrogenic cytokines. (Dinarelli et al., J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 323; Duff and Atkins, J. Immunol. Methods, 1982, 52, 323). Since then, several different test systems using different sources of human monocytes, including human peripheral whole blood (WB), PBMCs, or monocytic cell lines, such as MONOMAC-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock et al., Int. J. Cancer, 1988, 41, 456) or THP-1 (Tsuchiya et al., Int. J. Cancer, 1980, 26, 171), and various readouts, including the pyrogenic cytokines tumor necrosis factor alpha, TNF- α , IL-6, IL-1 β , and the non-pyrogenic

45

metabolite neopterin (Hartung et al., The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 43, 2001, 29, 99; Poole and Gaines Das, Eur J Parenteral Sciences, 2001, 6, 63; Poole et al., J. Immunol. Methods, 2003, 274, 209; Gaines Das et al., J Immunol Methods, 2004, 288, 165), have been developed. Recently, in a collaborative European study, the Human(e) Study, six of the most prominent monocyte activation tests, each using a different combination of the above described cell sources and readouts were evaluated for the ability to detect endotoxin in medical products spiked with various concentrations of pure endotoxin.

[0009] In five of the six tests, the cells were cultured on 96-well polystyrene plates with flat bottomed wells (Hoffmann et al., J. Immunol. Methods, 2005, 298, 161). In the sixth test (based on Fennrich et al., Dev. Biol. Stand., 1999; Fennrich et al., ALTEX, 1999; Hartung et al., 2001), Eppendorf centrifuge tubes (1.2 ml) made of polystyrene, with conical bottoms, were used for the greater part of the evaluation and, part way into the study, polypropylene tubes (1.5 ml), with round bottoms, were substituted for the polyethylene tubes by Charles River Laboratories, the manufacturer of the Endosafe[®] In vitro Pyrogen Test (IPT) kit used in the study. This substitution was not reported to have any significant effect on the test, and the polypropylene tubes themselves were thereafter replaced with flat-bottomed polystyrene 96-well plates, when Charles River Laboratories modified the Endosafe[®] IPT for reduced volumes. The source of monocytes in this test was whole blood and the readout was IL-1 β . Whole blood was incubated with various drugs spiked with different concentrations of endotoxin.

[0010] Carlin and Viitanen disclose a monocyte activation test, based on whole blood or MONOMAC-6 cells as the source of monocytes and IL-6 as the readout, for evaluating the *inherent* pyrogenicity of the vaccine Infanrix, which contains Gram-positive and Gram-negative antigens, including various non-endotoxin pyrogens, i.e., *Diphtheria* toxoid, *Pertussis* toxoid, and *Tetanus* toxoid (Pharmeuropa, 2003, 15, 3, 418-423). Cells were cultured at low cell density in endotoxin-free Eppendorf Bio-Pure grade tubes of undisclosed composition. The pyrogenicity of the vaccine was not the result of contamination of the vaccine during its manufacture or storage. Hartung and Wendel disclose a monocyte activation test, based on whole blood as the source of monocytes and IL-1 β as the preferred readout, for detecting endotoxin and non-endotoxin pyrogens in their pure forms, i.e., LPS from *Salmonella abortus equi*, streptolysin O (SLO) from *Streptococcus pyrogens*, and muramyl dipeptide (MDP) (Hartung and Wendel, In Vitro Toxicology,

1996, 9, 4, 353-359; U.S. Patent No. 5,891,728). Cells were cultured in polypropylene tubes.

[0011] Yamamoto et al. disclose a monocyte activation test, based on whole blood or cells from different human cell lines, the 28SC cell line being preferred, as the source of monocytes/monocytic cells and IL-6 as the preferred readout, for detecting endotoxin pyrogens (Jpn. J. Infect. Dis., 2003, 56, 93-100). The endotoxin test is said to predict the possibility of an *in vivo* synergism between endotoxin and a parenteral drug, particularly interferon, such that the drug augments the pyrogenic effects of the endotoxin. Cells were cultured with either endotoxin in its pure form or a mixture of endotoxin in its pure form and human interferon. Cell line cells were cultured in polystyrene 96-well plates with flat-bottomed wells. Blood cells were cultured in tubes of unspecified material.

[0012] Nakagawa et al. describe a monocyte activation test, based on whole blood or MM6-CA8 cells (a subclone of MONOMAC-6) as the source of monocytes and IL-6 as the preferred readout, for detecting endotoxin and non-endotoxin pyrogens in their pure forms, i.e., LPS from *E. coli* O55:B5 and insoluble peptidoglycan (PG) derived from *S. aureus* (Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol., 2002, 9, 3, 588-597). MM6-CA8 cells were cultured in polystyrene 96-well plates. Blood cells were cultured in polypropylene tubes; the volumes used (225 μ L of blood, 25 μ L of test solution, 750 μ L of saline) precluded the use of standard 96-well plates (250 μ L/well).

[0013] Recently, various sources indicate that polypropylene is to be avoided in pyrogen testing. For example, Charles River Laboratories recommends avoiding polypropylene because the hydrophobic nature of a polypropylene surface could result in the adsorption of endotoxin on such a surface due to the hydrophobic domains associated with the Lipid A component of LPS (Charles River Laboratories, Endosafe Times, Sept. 2004). Harlan Sera-Lab, a manufacturer of biosafety tests, states that polypropylene tubes can interfere with the LAL assay (Harlan Sera-Lab, 2004 Catalogue). And, the European Dialysis and Transplant Nurses Association as well as the European Renal Care Association recommend avoiding polypropylene and using polystyrene in endotoxin testing because polystyrene does not normally adsorb endotoxin (EDTNA/ERCA Guidelines).

[0014] Thus, a need exists for a non-animal-based pyrogen test, characterized by high sensitivity, high specificity, and the ability to detect a wide range of pyrogenic contaminants in medical products.

47

SUMMARY OF THE INVENTION

[0015] Applicants have developed an in-vitro pyrogen test that is sensitive and detects pyrogenic contaminants present in medical products. Generally, the present invention is directed to a method of detecting non-endotoxin pyrogens in a sample by combining monocytes, i.e., in the form of a monocyte-containing reagent, and the sample to be tested in a first assay system comprising at least one surface comprising polypropylene, such that the monocytes are in contact with the surface. The monocytes and the sample are incubated so that the monocytes produce a cytokine or an endogenous mediator of the inflammatory response during incubation. The contents of the first assay system are transferred to a second assay system comprising at least one surface treated with an antibody to a cytokine or an endogenous mediator or marker of the inflammatory response. The second assay system is assayed for the presence of cytokine or endogenous mediator bound to the antibody on the surface. When the monocytes used in this method are PBMCs or monocytic cell line cells, the monocytes are present in the assay systems at a high cell density.

[0016] The present invention is also generally directed to a method of detecting non-endotoxin pyrogens in a parenterally-administered medical product by combining whole blood, as the monocyte-containing reagent, and the medical product to be tested in a first assay system comprising at least one surface comprising polypropylene, such that the blood is in contact with the surface. The blood and the medical product are incubated such that the blood produces the cytokine IL-6 during incubation. The contents of the first assay system are transferred to a second assay system comprising at least one surface treated with an antibody to IL-6. The second assay system is assayed for the presence of IL-6 bound to the antibody on the surface.

[0017] The present invention is further drawn to a method of culturing monocytes, i.e., in the form of a monocyte-containing reagent, for use in a non-endotoxin pyrogen test by combining the monocytes and a sample to be tested in an assay system comprising at least one surface comprising polypropylene, such that the monocytes are in contact with the surface.

[0018] The invention is also drawn to a method of culturing monocytes as part of a non-endotoxin pyrogen test by combining the monocytes and a sample in an assay system comprising at least one microtiter well shaped such that the monocyte-containing reagent is concentrated as compared to a flat-bottomed microtiter well, a surface of the well comprising polypropylene, such that the monocytes are in contact

with the surface. When the monocytes used in these culturing methods are peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or monocytic cell line cells, the monocytes are present in the assay systems at a high cell density.

[0019] The invention is also directed to a method of detecting non-endotoxin pyrogens in a parenterally administered medical product by combining whole blood, as the monocyte-containing reagent, and the medical product to be tested in an assay system comprising at least one surface comprising polypropylene and at least one surface treated with an antibody to IL-6, such that the blood is in contact with the surface comprising polypropylene, and assaying the assay system for the presence of IL-6 bound to the antibody on the surface.

[0020] The invention further provides a diagnostic kit which contains a microtiter plate comprising a plurality of microtiter wells shaped such that culture medium contained in each well is concentrated as compared to a flat-bottomed microtiter well, a surface of each well comprising polypropylene, and cryopreserved monocytes, i.e., in the form of a cryopreserved monocyte-containing reagent, contained in the wells of the microtiter plate, such that the monocytes are in contact with the surfaces of the wells. When the monocytes in the kit are peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or monocytic cell line cells, the monocytes are present in the wells at a high cell density.

[0021] The invention also provides a diagnostic kit which contains an assay system for detecting non-endotoxin pyrogens in a parenterally administered medical product, the assay system comprising a microtiter plate comprising a plurality of microtiter wells shaped such that culture medium contained in each well is concentrated as compared to a flat-bottomed microtiter well, a surface of each well comprising polypropylene, cryopreserved whole blood, as the cryopreserved monocyte-containing reagent, contained in the wells of the microtiter plate, such that the blood is in contact with the surfaces of the wells, and an antibody to IL-6.

[0022] Other objects and features of this invention will be in part apparent and in part pointed out hereinafter.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0023] Figure 1 is a graph depicting IL-6 responses for test samples having four different cell densities (1 million, 0.5 million, 0.25 million and 0.13 million PBMC per 250 μ l well) in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polypropylene plates with round-bottomed wells, with IL-6 as the readout. IL-6 responses are to endotoxin standard (1 endotoxin unit per ml) and

Extraneal® positive control (i.e. a batch of this product contaminated with non-endotoxin pyrogen).

[0024] Figure 2 is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with whole blood on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS, Extraneal® negative control (i.e. a clean batch of this product), Extraneal® positive control, Hemoglobin (Hb) negative control (i.e. a clean batch of this product), and Hemoglobin (Hb) positive control (i.e. a batch of this product contaminated with non-endotoxin pyrogen).

[0025] Figure 3 is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS, Extraneal® positive and negative controls and Hb positive and negative controls.

[0026] Figure 4 is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with MONOMAC6 cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS, Extraneal® positive and negative controls and Hb positive and negative controls.

[0027] Figure 5 is a graph depicting IL-6 responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with THP-1 cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS, Extraneal® positive and negative controls and Hb positive and negative controls.

[0028] Figure 6 is a graph illustrating TNF- α responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with THP-12A9 cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. TNF- α responses are to LPS, Extraneal® positive and negative controls and Hb positive and negative controls.

[0029] Figure 7 is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with MONOMAC6-CA8 clone cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS, and Extraneal® positive and negative controls.

[0030] Figure 8 is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with 28SC cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS and dextran positive and negative controls.



[0031] Figure 9 is a graph depicting IL-6 responses for test samples having high cell density in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polypropylene plates with round-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS, Extraneal[®] positive and negative controls and dextran positive and negative controls.

[0032] Figure 10 is a graph depicting IL-6 responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with whole blood on polypropylene plates with round-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS, and Extraneal[®] positive and negative controls.

[0033] Figure 11A is a graph depicting IL-6 responses for polypropylene plates (black columns) and polystyrene plates (grey columns) in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells (1 million cells per well). IL-6 responses are to LPS, Extraneal[®] positive and negative controls and Hb positive and negative controls.

[0034] Figure 11B is a graph depicting IL-1 β responses for polypropylene plates (black columns) and polystyrene plates (grey columns) in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells (1 million cells per well). IL-1 β responses are to LPS, Extraneal[®] positive and negative controls and Hb positive and negative controls.

[0035] Figure 12A is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having high cell density in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polypropylene plates with round-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS and Extraneal[®] positive and negative controls.

[0036] Figure 12B is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having low cell density in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS and Extraneal[®] positive and negative controls.

[0037] Figure 13A is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having high cell density in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polypropylene plates with round-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS and Extraneal[®] positive and negative controls.

[0038] Figure 13B is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having high cell density in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS and Extraneal[®] positive and negative controls.

51

[0039] Figure 14A is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having high cell density in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polypropylene plates with round-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS and Extraneal® positive and negative controls.

[0040] Figure 14B is a graph illustrating IL-6 responses for test samples having high cell density in a monocyte activation test carried out with peripheral blood mononuclear cells on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-6 responses are to LPS and Extraneal® positive and negative controls.

[0041] Figure 15 is a graph illustrating IL-1 β responses for test samples having high cell density in a commercially available IPT test carried out with whole blood on polystyrene plates with flat-bottomed wells. IL-1 β responses are to LPS, Extraneal® positive and negative controls, hemoglobin positive and negative controls, saline control and gram positive control.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0042] Pyrogens stimulate blood monocytes (as well as other leukocytes) and macrophages to produce and release numerous endogenous pyrogenic mediators of the inflammatory response, including cytokines (e.g. TNF- α , IL-1 β , and IL-6). The release of these pyrogenic mediators into the circulation triggers a cascade of events leading to an inflammatory response in the affected individual. The monocyte activation test of the present invention relies on the measurement of these endogenous pyrogens as a marker for an inflammatory response. According to a preferred embodiment of the present invention, a sample is incubated with a monocyte-containing reagent in a first assay system comprising a surface comprised of polypropylene, the monocyte-containing reagent being present in the assay system at a high cell density. The contents of the first assay system are then transferred to a second assay system comprising a surface coated with anti-cytokine antibodies, and the second assay system is assayed for the presence of cytokines bound to the surface by the antibodies.

[0043] The pyrogen tests of the present invention are used to detect non-endotoxin pyrogens, i.e., Gram-positive bacteria (e.g., *Staphylococcus aureus*) or their components (e.g., mucopeptide, lipoteichoic acid, enterotoxins, streptolysin), immune stimulators such as phytohemagglutinin or phorbol esters, as well as endotoxin. Because the test utilizes the cytokine response of monocytes to diverse pyrogens rather than a response specific to Gram-negative bacterial endotoxin, a

32

wide spectrum of pyrogenic agents can be detected with the test of the present invention.

[0044] The pyrogen tests of the present invention have been shown to be more effective in detecting non-endotoxin pyrogen in contaminated lots of a medical product as compared to conventional tests. The examples herein show that these conventional tests are incapable of distinguishing positive control samples of Extraneal[®] peritoneal dialysis solution, hemoglobin, or dextran from negative control samples of the same parenterals. The Extraneal[®] positive control sample was obtained from a product lot contaminated with non-endotoxin pyrogen; the contaminated lot caused adverse reactions in humans but tested negative for the presence of pyrogen according to an LAL test, which only tests for endotoxin pyrogens (Martis, et al., Lancet, 365(9459), 588). The hemoglobin positive control sample was also obtained from a product lot contaminated with non-endotoxin pyrogen; the contaminated lot caused fever responses in rabbits, but tested negative for the presence of pyrogen according to an LAL test. The dextran positive control was a preparation of dextran that had been found to cause fever in humans but tested negative for the presence of pyrogen according to an LAL test. The ability of the test to detect non-endotoxin contaminants in medical products is of great value as it enables identification of contaminated medical product lots before the lot is released for use in patients. Known tests function well in the context of detecting pure non-endotoxin and endotoxin pyrogen, i.e., peptidoglycan (PG) from *S. aureus* and LPS from *E. coli* as disclosed by Nakagawa et al. as discussed above, or the endotoxin spiking of products, i.e., various drugs were spiked with different concentrations of endotoxin in the six tests of the Human(e) Study as discussed above. LAL tests function effectively provided a medical product is contaminated with endotoxin (Mascoli, C.C., Weary, M.E., J Parenter Drug Assoc. 2003, 33, 81; Mascoli, C.C., Weary, M.E., Prog Clin Biol Res. 2003, 29, 387). However, when a medical product is contaminated with non-endotoxin pyrogen, such tests fail to detect the pyrogen. Without being bound to a particular theory, it is believed that the non-endotoxin pyrogen interacts with the medical product resulting in a "masking" of the pyrogen and the inability to detect non-endotoxin contaminants.

[0045] The pyrogen tests of the present invention overcome this masking effect and are capable of detecting non-endotoxin contaminants in medical products: for example, in a preferred embodiment, in which PBMCs were cultured at a high cell density in round-bottomed polypropylene wells, the pyrogen test of the present invention was capable of distinguishing between positive and negative control

53

samples of Extraneal[®] solution and dextran (see Figure 9). None of the available kits that were tested were capable of distinguishing between positive and negative Extraneal[®] or hemoglobin controls (see Figures 1-8). Again, without being bound to a particular theory, it is believed that high cell densities provide more cells for greater cell to cell contact. Increased cell to cell contact facilitates greater communication between cells and, therefore, results in an enhanced inflammatory response to a pyrogenic contaminant. Cells communicate with each other via soluble mediators, such as cytokines, and via cell to cell contact, in which cytokines can also take part. A round-bottomed well, or a well generally shaped such that cells are concentrated, provides greater cell to cell contact as compared to a flat-bottomed well. And, it is believed that polypropylene increases the bioavailability of non-endotoxin pyrogens. Again, without being bound to a particular theory, it is believed that surface treatment of polystyrene plates as conventionally used in cell culture makes their surface less hydrophobic and better able to bind cells but also causes their surface to bind and neutralize non-endotoxin pyrogens. The polypropylene plate is not surface-treated so that it remains more hydrophobic than the polystyrene plate and less likely to neutralize non-endotoxin pyrogens.

1. Pyrogen Test Components

[0046] A pyrogen test which is characterized by some combination of the three elements described above, high cell density, round-bottom (or a different, appropriate shape), and polypropylene, i.e., PBMCs present at a high cell density in a round-bottomed polystyrene well, allows for improved detection of non-endotoxin contamination in medical products. The pyrogen tests of the present invention can be used to test a variety of medical products for the presence of non-endotoxin contamination, including blood products, medical products for parenteral administration, dialysates, vaccines, intravenous solutions, and any fluid that contacts the body or bodily fluids.

A. Cytokine or Endogenous Mediator of the Inflammatory Response

[0047] Any endogenous mediator of the inflammatory response secreted by the monocyte-containing reagent that is detectable may be used as the basis of the pyrogen test of the present invention. Preferably, however, a cytokine or endothelin marker is employed because they are easy to detect by the method of the invention. It has been found that monocytes in whole blood incubated with an endotoxin or non-endotoxin pyrogen produce several classes of cytokines, including, but not limited to

54

pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6), anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, IL-1ra, TGF), Th1 (IL-2, IFN, IL-12), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), IL-1 β , IL-1ra, IL-8, and PGE₂. Preferred cytokine markers for use in the invention include TNF- α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8 and PGE₂. IL-6 is a particularly preferred cytokine marker to assay in the present invention. IL-6 is produced in detectable amounts within a relatively short incubation period. Immunoreactive IL-6, unlike immunoreactive IL-1 β and TNF α , is secreted entirely into the cell-conditioned medium/blood, in large quantities, permitting its complete estimation. In contrast, immunoreactive TNF α and IL-1 β remain largely intracellular, raising the possibility that test preparations affecting cell-permeability might more easily interfere in the test with (immunoreactive) TNF α or IL-1 β as the readout, rather than IL-6 (see Figures 2 and 3). Nevertheless, TNF- α or IL-1 β could also be used as a cytokine marker in the present invention. TNF- α is produced earlier than IL-6 in the monocyte pyrogen response. Thus, an embodiment of the invention which assays TNF- α would use a shorter incubation time (~1 to 2 hours) than embodiments which assay IL-6. Different pyrogenic contaminants may elicit different cytokine responses in the cell culture. Therefore, the invention may be tailored to detect the formation of particular cytokines when contamination with a particular pyrogen which causes secretion of those cytokines is probable for a pharmaceutical product.

B. Antibody to the Cytokine or Endogenous Mediator

[0048] Once the cytokine to be assayed has been determined, an antibody to that cytokine must be made for use in the present invention. Polyclonal antibodies purified under stringent conditions, as described in Example 1 of U.S. Patent No. 6,696,261, which is incorporated herein by reference in its entirety, work well in the pyrogen test. Because the animal blood from which the polyclonal antibodies are isolated is naturally pyrogen-free (if taken from healthy animals), one must simply prevent contamination of the raw materials with pyrogens during purification to obtain a pyrogen-free product. Pyrogen-free buffers and solid phases are used in affinity chromatography columns to obtain pyrogen-free polyclonal antibodies as described in Example 1 of U.S. Patent No. 6,696,261. Alternatively, monoclonal antibodies from hybridoma cultures can be used. However, when using monoclonal antibodies, care must be taken to isolate the antibodies from any contaminating pyrogen which may be present in the hybridoma cell culture.

55

[0049] For use in the present invention, the antibody to the cytokine is applied to a surface in an assay system. Methods, such as coating, for binding antibodies onto a surface in an assay system, such as a microtiter well, are well known in the biochemical arts. Many assay systems are available commercially, and the manufacturer usually provides materials and instructions for coating antibodies onto a surface of the system. Because of their ease of reading and the small sample volume required, microtiter wells in which a portion of the interior surface of the well is coated by the antibody are used in a preferred embodiment of the present invention. In order to fully exploit the advantages of the invention, it is preferred that the microtiter well be part of a microtiter plate, which is a planar array of similar wells, situated so that the array of wells may be read with automated immunoassay plate reading equipment (see, e.g., U.S. Patent No. 5,281,540, hereby incorporated by reference). Automated equipment such as ELISA plate readers (e.g., the Ultramark Microplate Reader, available from Bio-Rad Laboratories, Inc.), automate the assay evaluation process and greatly decrease the per-test cost. If desired, microtiter well plates can be rendered pyrogen-free (if not already supplied as such) by extensive washing with pyrogen-free buffer. In a particularly preferred embodiment of the present invention, anti-IL-6 polyclonal antibodies are coated onto the wells of an ELISA plate. However, other immuno-diagnostic test formats (e.g., in which the antibody is coated on a dipstick or bead) are acceptable for use in the present invention.

[0050] In addition to the "capture" antibody, other antibodies and reagents for use in assaying the cytokine may be applied when making microtiter plate systems for use in the present invention. For instance, after the capture antibody is applied to the microtiter plate, the remaining binding sites of the plate can be "blocked" with another protein. After blocking, a labeled detection antibody (such as a biotinylated or enzyme-labeled antibody) can be applied to the microtiter plate, along with a protective glazing compound. Thus, when a sample is incubated in the microtiter well, as described below, a released cytokine is captured by the capture antibody bound to the well and labeled by the detecting antibody simultaneously during the sample incubation period.

C. Monocyte-Containing Reagent

[0051] As the first step in the pyrogen tests of the present invention, cells contained within a monocyte-containing reagent are cultured by combining the monocyte-containing reagent and a sample to be tested in an assay system. The

56

monocyte-containing reagent of the present invention is selected from the group consisting of PBMCs, monocytic cell line cells, whole blood, or any cell line that expresses or can be made to express the Toll-like receptors (TLRs) that are involved in mediating responses to pro-inflammatory and pyrogenic agents, including cells into which these receptors have been induced or cloned. Preferably, the monocytic cell line is selected from the group consisting of MONOMAC-6 (MM6), THP-1, and 28SC. The monocytes in the monocyte-containing reagent preferably are monocytes from the same species to whom the product tested is to be administered (i.e., human for pharmaceutical products; cat, dog, horse, etc. for veterinary products). However, monocytes from other species with the desired pyrogen reactivity may also be used. In certain preferred embodiments, the monocyte-containing reagent comprises PBMCs.

[0052] In one embodiment of the invention, the monocyte-containing reagent is whole blood and the assay system includes at least one surface comprising polypropylene, such that the monocyte-containing reagent is in contact with the surface.

[0053] In another embodiment, the monocyte-containing reagent is PBMCs present in high cell density, and the assay system includes at least one surface comprising polypropylene, polyethylene, polystyrene, or another similar material in contact with the PBMCs.

[0054] When the monocyte-containing reagent is PBMCs or cell line cells, the reagent is present in the assay system at a high cell density, to facilitate greater cell to cell contact, as explained above in detail. In certain embodiments, the monocyte-containing reagent is present in the assay system at a cell density per well of at least about 125,000 cells, at least about 250,000, 500,000, 600,000, 700,000, 800,000, 900,000, 1,000,000, 1,100,000, 1,200,000, 1,300,000, 1,400,000, 1,500,000, 1,600,000, 1,700,000, 1,800,000, 1,900,000 or 2,000,000 cells per well. One of ordinary skill in the art would recognize that the maximum cell density is exceeded when insufficient cell nutrients exist in the volume of reagent within the well to properly maintain the cells within the well.

[0055] When the monocyte-containing reagent is whole blood, the reagent is present in the assay system at a lower cell density than PBMCs or cell line cells. In certain embodiments where the monocyte-containing reagent is blood, the reagent is present in the assay system at a cell density of at least about 100,000 peripheral blood mononuclear cells per well, at least about 200,000, 210,000, 220,000, 230,000, 240,000, 250,000, 260,000, 270,000, 280,000, 290,000, 300,000, 310,000, 320,000,

57

330,000, 340,000, 350,000, 360,000, 370,000, 380,000, 390,000 or 400,000 PBMC per well. Without being bound to a particular theory, it is believed that whole blood can be used at a lower cell density as compared to PBMCs or cell line cells because monocytes are in their natural environment and all serum components which may influence their response to pyrogens are present in solution. Furthermore, when the monocyte-containing reagent comprises whole blood, the readout used for the pyrogen test is IL-6.

[0056] Preferably, when blood is used as the monocyte-containing reagent, the blood is fresh, or less than 24 hours old, and more preferably less than 4 hours old. Also, when whole blood is used, anticoagulants can be included to retard or prevent blood clotting; suitable anticoagulants include citrate (for example, to a final concentration of 0.38%), heparin (sodium heparinate), or fragmin (low molecular weight heparin). Anticoagulant additives can be used without affecting the response of the monocytes to pyrogens in the test sample. Whole blood can also be diluted with an appropriate buffer or other diluent, such as RPMI cell culture media or physiological saline. Whole blood is preferably diluted to at least 50%, more preferably to about 5% to about 25%, and more preferably about 20% of the final volume for incubation (see Figure 1 of U.S. Patent No. 6,696,261). By diluting whole blood, the IL-6 response curve of the majority of donors may be brought within a compact range that can be used to quantify a wider range of pyrogen contamination concentrations (see Figure 3 of U.S. Patent No. 6,696,261).

2. Two Assay System

[0057] In certain embodiments of the present invention, the pyrogenicity test is carried out in a two assay container system, such that the steps of sample incubation with the monocyte-containing reagent and the capture of cytokine(s) produced by the monocyte-containing reagent occur in two different assay container systems. The incubation step follows the culturing step described above; incubation of the test sample with the monocyte-containing reagent (such as PBMCs) is performed in the same assay system as the culturing step. The optimal incubation time for use in the pyrogen test of the present invention will vary depending on the assay conditions, namely the cytokine which is assayed. For example, when whole blood is incubated with endotoxin and the readout is IL-6, minimal additional cytokine is produced by the monocyte-containing reagent after incubation for 6 hours; after 4 hours of incubation, a sufficient amount of IL-6 has been secreted by the reagent to allow quantification of the pyrogen contaminant. When whole blood is incubated with

non-endotoxin pyrogen and any readout is used, a sufficient amount of IL-6 has been secreted by the reagent to allow quantification of the pyrogen contaminant after about 16-24 hours of incubation. For an embodiment of the present invention which assays IL-6 production, an incubation time of about 6 to about 24 hours, more preferably about 12 to about 24 hours, and most preferably about 16 to about 24 hours is preferred. If another cytokine is assayed, the incubation period should be optimized for the production of that particular cytokine. Such optimization is within the abilities of the person of ordinary skill in the art. If the cytokine to be assayed is not released by the monocytes, the cells can be lysed by freeze thawing, or by adding a detergent at the end of the incubation period in a concentration which will not disrupt binding of ligands to antibodies.

[0058] Once the incubation step is completed, the contents of the assay system (the first assay system), namely the monocyte-containing reagent and the test sample, are transferred to a second assay system which comprises at least one surface treated with an antibody to a cytokine or an endogenous mediator of the inflammatory response, e.g., endothelin. The second assay system is assayed for the presence of cytokine or endogenous mediator on the surface coated with the anti-cytokine or anti-endogenous mediator antibody. Preferably, rigorous, sterile conditions are maintained at all points in the procedure before the antibody coated surface is assayed for bound cytokine. If an ELISA plate coated with a capture antibody is used as the embodiment of the present invention, the plate is washed, and a second anti-cytokine antibody conjugated with an enzyme is added to the ELISA plate (unless the second, labeled, "detecting" antibody was initially added to the plate before glazing or together with the contents of the first assay system). The ELISA plate is washed again, and addition of a substrate to the ELISA plate will produce a color. After a short incubation time, the reaction is terminated, and the optical density of the solution is measured on an ELISA plate reader. This process is further described in Example 2 of U.S. Patent No. 6,696,261. Alternatively, non-enzymatic immunoassay techniques may be used. For instance, the second antibody of the immunoassay "sandwich" may be labeled with a fluorescent moiety or a radioactive isotope. After washing, the amount of cytokine captured in the well can be quantified by detecting the amount of fluorescence or radiation present in the well. Several enzymatic and non-enzymatic based assay systems are available commercially and can be easily modified for use in the present invention by one of ordinary skill in the art.

3. One Assay System

[0059] In certain embodiments of the present invention, the pyrogenicity test is carried out in a one assay container system, such that the steps of sample incubation with the monocyte-containing reagent and the capture of cytokine(s) produced by the monocyte containing reagent occur in the same assay container system. The assay system comprises at least one surface comprising polypropylene and at least one surface treated with an antibody to a cytokine or an endogenous mediator of the inflammatory response. The incubation step follows the culturing step described above and is performed in the same assay system as the culturing step. As described above in the context of the two assay container system, the optimal incubation time for use in the pyrogen test of the present invention will vary depending on the assay conditions, namely the cytokine which is assayed. Generally, the teachings regarding the incubation step discussed with respect to the two assay container system apply to the one assay container system as well. The incubation period should be optimized for the production of a particular cytokine and such optimization is within the abilities of the person of ordinary skill in the art. If the cytokine to be assayed is not released by the monocytes, the cells can be lysed by freeze thawing, or by adding a detergent at the end of the incubation period in a concentration which will not disrupt binding of ligands to antibodies.

[0060] Once the incubation step is completed, the assay system, which comprises at least one surface treated with an antibody to a cytokine or an endogenous mediator of the inflammatory response, e.g., endothelin, is assayed for the presence of cytokine or endogenous mediator on the surface coated with the anti-cytokine or anti-endogenous mediator antibody. Preferably, rigorous, sterile conditions are maintained at all points in the procedure before the antibody coated surface is assayed for bound cytokine. Generally, the discussion regarding the assaying step of the two assay container system, i.e., the discussion of the ELISA plate and non-enzymatic immunoassay techniques, apply to the one assay container system as well.

[0061] In general, the one assay container system and the two assay container system are interchangeable.

4. Assay Containers

[0062] The assay systems of the present invention comprise at least one surface in contact with the monocyte-containing reagent. In certain embodiments of the present invention the assay system(s) includes at least one microtiter well, and

60

the surface is at least a portion of the interior of the microtiter well. In particular embodiments, the surface of the microtiter well comprises a polypropylene coating or the entire microtiter well is composed of polypropylene. In certain embodiments where the assay system comprises at least one surface treated with an antibody to a cytokine or to an endogenous mediator of the inflammatory response, the surface on which the antibody is applied is at least a portion of the interior of the microtiter well. Preferably, the microtiter well is shaped such that the monocyte-containing reagent is concentrated as compared to a flat-bottomed microtiter well.

[0063] In certain embodiments, the microtiter well(s) comprises an open top, an upper region extending downwardly from the open top, and a bottom wall tapering in diameter from a location above the lowest point to the lowest point.

[0064] In certain embodiments, the microtiter well(s) comprises an open top, an upper region extending downwardly from the open top having a top end and a bottom end, and a bottom region having a top end and a lowest point, the bottom region extending from the bottom end of the upper region and tapering in diameter more rapidly than the upper region from the top end of the bottom region toward the lowest point.

[0065] In certain embodiments, the bottom wall of said microtiter well is non-planar, preferably curved, sometimes parabolic. In certain particular embodiments, the bottom wall is downwardly extending, or the sides of the microtiter well are sloped inward.

5. Diagnostic Kit

[0066] Any one of the embodiments described above can be incorporated into a diagnostic kit for performing pyrogen tests. The kit is used to detect a variety of non-endotoxin pyrogens, including Gram-positive bacteria (e.g., *Staphylococcus aureus*) or their components (e.g., muropeptide, lipoteichoic acid, enterotoxins, streptolysin), as well as endotoxin pyrogens in a variety of medical products, including blood products or other parenterals, such as dialysates, vaccines, and intravenous solutions. Generally, such a kit includes a microtiter plate comprising a plurality of microtiter wells shaped such that culture medium contained in each well is concentrated as compared to a flat-bottomed microtiter well, the wells comprising at least one surface comprising polypropylene. The wells of the microtiter plate contain cryopreserved monocyte-containing reagent comprising cryopreserved whole blood, cryopreserved peripheral blood mononuclear cells or cryopreserved monocytic cell line cells, which are in contact with the surfaces of the wells. In certain

61

embodiments, the wells of the microtiter plate comprise polypropylene. When the cryopreserved monocyte-containing reagent comprises cryopreserved peripheral blood mononuclear cells or cryopreserved monocytic cell line cells, the reagent is present in the wells at a high cell density. Kits containing cryopreserved whole blood as the monocyte-containing reagent also contain antibody to IL-6, as IL-6 is the preferred readout.

[0067] In particular embodiments, the wells include a barrier which is impervious to monocytes. The barrier comprises at least one surface comprised of a pyrogen-free material, and is typically a membrane, a grid, a sieve, or a sifter. The barrier is preferably sterile. Suitable barrier materials for use with microtiter plates are known in the art. The barrier, which is permeable to fluids, allows cryopreserved cells to be washed without being removed from the wells; dimethyl sulfoxide (DMSO), which bathes cryopreserved cells and acts as a preservative, can be removed so that it does not interfere with the testing. Test samples are added above the barrier, penetrate the barrier, contact cells below the barrier, and potentially stimulate these cells to produce cytokines. Cytokines released by cells diffuse into the medium above the barrier. Typically, the solutions above and below the barrier are thoroughly mixed, by aspirating the solutions. Subsequently, an aliquot of well-mixed medium from above the barrier is assayed for the presence of cytokine or an endogenous mediator of the inflammatory response.

6. Interpretation of Cytokine Production Data

A. Standard Curve Method

[0068] In order to properly interpret the cytokine production data generated in the pyrogen test of the present invention, an endotoxin standard curve is generated by incubating the monocyte-containing reagent with USP standard endotoxin. The purpose of this is to quantify the cytokine production response measured for a test sample in terms of the response observed for a known pyrogen. A standard curve may be generated from any statistically significant number of data points generated with significantly varied concentrations of standard endotoxin by utilizing standard best-fit data analysis software. Methods of generating such standard curves are generally known in the art. Applicants have found that data points of 10, 4, 1, 0.25, 0.06, 0.03, and 0 EU/ml of endotoxin are suitable for generating a standard curve, but any statistically significant number of concentrations through a similar range would be suitable. Once a standard curve is generated, the equivalent non-endotoxin concentration (quantified in endotoxin unit-equivalents) may be

interpolated from the cytokine response using the standard curve. As the response of whole blood-based monocyte-containing reagents can vary significantly from donor to donor, it is important to generate a standard curve for each set of assays performed with a particular lot of monocyte-containing reagent. However, because the preferred ELISA plate embodiment of the invention utilizes very small amounts of human blood (about 40 μ L/well), a single unit of donated blood can be used for several hundred wells. The standard curve generated using the USP endotoxin aids in the normalization of the data in terms of relating to endotoxin units (EU, as defined by the USP/FDA, which are identical to IU, international units as defined by WHO), which is the industry standard for expressing endotoxin/pyrogen contamination.

B. Reference Lot Method

[0069] Alternatively, the cytokine production data generated in the pyrogen test of the present invention may be interpreted by comparing cytokine responses elicited by test lots of a product to those elicited by reference lots of a product, a contaminated reference lot and an uncontaminated reference lot. First, the two reference lots of a medical product are identified: the reference lots are pyrogen tested and the cytokine responses elicited by these lots are measured. Then, test lots are pyrogen tested and the responses elicited from these lots are compared to those of the reference lots. Generally, a test lot will be deemed uncontaminated if it elicits a lesser response than the contaminated reference lot and a response similar to that of the uncontaminated reference lot. Each test lot may be tested once or several times. For example, according to one reference lot method, a product was deemed uncontaminated if it elicited the release of no more than two times as much IL-6 as the uncontaminated reference lot in four out of four donors or seven out of eight donors; the test was conducted in quadruplicate using the blood of four different donors. A preferred reference lot method is described in Gaines-Das et al., 2004, in which the test sample is required to stimulate the release of less IL-6 than the reference. In that article, the test preparation is required to pass the test with the PBMNC from four different donors. If the test preparation passes the test with the PBMNC from three of the four donors, the test is continued with PBMNC from a further four donors, none of whom provided PBMNC for the first test, and the test preparation is required to pass the test with the PBMNC from seven of the eight different donors.

b3

[0070] Advantageously, the monocyte activation tests of the present invention are better able to detect the presence of a wide variety of pyrogens, including non-endotoxin pyrogens, in medical products such as blood products, intravenous solutions, and vaccines.

DEFINITIONS

[0071] As used herein, the term "pure" endotoxin or non-endotoxin pyrogen or pyrogen in its "pure form," refers to endotoxin that has been stripped of its associated protein. Pure endotoxin is also known as lipopolysaccharide (LPS).

[0072] The term "monocyte-containing reagent" means any solution of monocytic leukocyte cells of the immune system. Preferably, these cells are derived from the organism to whom the product which is being tested is to be administered (i.e., human for pharmaceutical products, cat, dog, horse, etc. for veterinary products). An example of a monocyte-containing reagent is whole human blood.

[0073] The term "assay system" means any container and surface which may be used in a monocyte activation test, including a container in which cells are cultured and incubated with a test sample as well as a container and surface with bound antibody which may be used in an immunoassay. Preferably, with regard to performing an immunoassay, such containers are microtiter well plates with antibody bound to a surface in the well, in which a large number of colorimetric enzyme-linked immunoassays may be carried out in parallel and which may be automatically evaluated by an ELISA plate reading machine. However, other immunoassay systems are envisioned, especially those where the coated surface is not necessarily part of the wall of the container. For instance, a larger test tube which contains a polystyrene bead or dipstick coated by the antibody could be used in the present invention.

[0074] The term "monocytic cell line" includes any cell line that has endogenous CD14 and/or Toll-like receptors (TLRs) or which has been transfected with CD14 and/or TLRs and/or reporter genes for inflammatory/pyrogenic mediators. The cell line does not have to be monocytic provided it has or has been transfected with the components of the "pyrogen receptors" present on monocytes: these components include TLRs and CD14. For example, Human Embryonic Kidney (HEK) cells already have most of the TLRs and can be stably transfected with the TLRs that they do not have – TLR2 and TLR4 – and also CD14 to make them sufficiently like a monocyte to function in the methods of the invention.

64

EXAMPLES

Example 1

[0075] Preparation of PBMC. PBMCs were isolated from human heparinized peripheral blood that was not more than 4 hours old by density-gradient centrifugation using Ficoll Paque Plus (Pharmacia #17-1440-02). The cells were washed twice with Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium and magnesium (Gibco #14190), re-suspended in Minimum Essential Media (MEM) (Gibco #11090), HEPES buffer (Gibco #15630), and 5 μ L of the donor's own heat-inactivated plasma (i.e., 2% of final concentration). The PBMCs were diluted to the required cell densities (8 million, 4 million, 2 million, and 1 million PBMCs per mL).

[0076] Cell Culturing. Cell cultures were carried out in quadruplicate on the following microtiter plates: Corning Costar #3790, #3359. 125 μ L of cell suspension containing 1 million, 0.5 million, 0.25 million, or 0.13 million cells was added to each well, followed by 125 μ L of test sample or standard endotoxin (0.0064-20 EU/mL). The 250 μ L mixture was gently mixed and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, in 5% CO_2 and in humidified air. The duration of the culture was 16 to 24 hours, after which time aliquots of the culture fluid were obtained, diluted 1 in 2 and 1 in 50, and assayed for IL-6.

[0077] ELISA for IL-6. 96-well plates (Immulon 4, Dynex #011-010-3855) were coated with 150 μ L of 3 $\mu\text{g/mL}$ mouse monoclonal IgG (R&D Systems #MAB206 dissolved in bicarbonate buffer, pH 9.5) by incubation overnight at $2-8^\circ\text{C}$. The plates were washed three times with 300 μ L wash buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4). Non-specific binding sites on the plates were blocked by adding 200 μ L of blocking solution (0.02 g/L Bovine Serum Albumin, Fraction V, protease-free). The plates were again washed three times with 300 μ L of the same wash buffer, and 100 μ L of samples (previously diluted 1 in 2 and 1 in 50 in sample diluent) or standards (7.8-1000 pg/mL of WHO international standard for IL-6, #89/548) were added to each well. 100 μ L of sample diluent was added to each unused well. The plate was covered with sealer (Falcon #3073) and incubated with shaking (approximately 300 rpm) for 1 hour $\pm$ 5 minutes.

[0078] The plate was then aspirated and washed five times with 300 μ L of wash buffer. Then, 100 μ L of 0.2 $\mu\text{g/mL}$ biotinylated goat anti-human IL-6 antibody (R&D Systems, #BAF206) was added to each well and the plate was again covered with sealer and incubated with shaking (approximately 300 rpm) for 1 hour $\pm$ 5 minutes.

[0079] The plate was then aspirated and washed five times with 300 μ L of wash buffer. Then, 100 μ L of 0.02 μ g/mL alkaline phosphatase (Rockland #S000-05) was added to each well and the plate was again covered with sealer and incubated with shaking (approximately 300 rpm) for 1 hour $\pm$ 5 minutes.

[0080] The plate was aspirated and washed five times with 300 μ L of wash buffer. Then, 200 μ L of 1 mg/mL pNPP in diethanolamine buffer with 0.5 mM MgCl_2 was added to each well. The plate was again covered with sealer and incubated with shaking (approximately 300 rpm) at room temperature until the largest concentration of the IL-6 standard curve (1000 pg/mL) had an optical density between about 2.5 and 3.0 at 405 nm, at which point the reaction was stopped by adding 50 μ L of 2M NaOH to each well. The optical density of each well was determined within 30 minutes of the reaction being stopped using a microplate reader set to 405 nm.

[0081] Figure 1 shows the effect of cell density on the IL-6 responses to endotoxin standard (1 EU/ml) and Extraneal[®] positive control. The Extraneal[®] positive control was contaminated with non-endotoxin pyrogen and caused an adverse drug reaction in human recipients of this lot of this drug but gave a negative response in the LAL test (Martis et al. 2005). Values are means $\pm$ standard error of the means of four replicate wells. Cell densities of 0.25 to 1 million PBMC per well responded similarly to the 1 EU/ml endotoxin standard. The positive control sample was best detected using 1 million > 0.5 million > 0.25 million >> 0.13 million cells per well.

Example 2 – Comparative Pyrogen Tests

[0082] The methods described herein as the current state of the art were replicated. None of these methods discriminate positive product controls for Extraneal[®] dialysis solution, hemoglobin and/or dextran from negative product controls.

[0083] The assays of Hoffman et al., 2005 were replicated as described therein using polystyrene microtiter plates with flat-bottomed wells and IL-6 readout. The monocyte-containing reagent was used in low cell density and was whole blood (75,000 cells per well), PBMCs (100,000 cells per well), MONOMAC6 (250,000 cells per well), or THP-1 (250,000 cells per well) in Figures 2-5, respectively. Note that in Figure 5, IL-6 readout was substituted for neopterin because IL-6 is an endogenous pyrogen (in contrast to neopterin) and a more robust readout in the methods of the invention. In Figure 6, THP-12A9 cells in low cell density (250,000 cells per well) were used as the monocyte-containing reagent and TNF was the readout.

66

[0084] The assay of Nakagawa et al. was replicated as described therein using 1,000,000 MONOMAC-CA8 clone cells per ml as the monocyte-containing reagent, IL-6 readout, and polystyrene microtiter plates with flat-bottomed wells. See Figure 7.

[0085] The assay of Yamamoto et al. was replicated as described therein using 1,000,000 28C cells per ml as the monocyte-containing reagent, IL-6 readout, and polystyrene microtiter plates with flat-bottomed wells. See Figure 8. However, the 28C cells were primed with calcitriol (100 ng/ml) rather than interferon gamma because the latter failed to give a dose-response curve to endotoxin standard.

Example 3 – Pyrogen Test of the Invention

[0086] Cultures (200 μ l) of 20% human whole blood (40 μ l = approx 60,000 PBMC/well = approx. 300,000 PBMC/ml) were carried out in quadruplicate on 96-well round-bottomed polypropylene plates (Costar #3790, Corning Incorporated, USA). The additions per well were: MEM-HEPES (60 μ l), blood from a single donor (40 μ l), endotoxin standard or Extraneal[®] samples diluted 1:1 with MEM-HEPES (100 μ l, i.e. the Extraneal[®] solution was at a final dilution of 1 in 4 in the well). The contents of the wells were mixed by swirling gently (without cross-contaminating wells) and incubated without vibration (to allow the cells to settle) at 37°C for 16-24h in an atmosphere of 5% CO₂ in air. At the end of the tissue culture incubation, 100 μ l aliquots of clear supernatant from each well were taken for assay of IL-6 by ELISA.

[0087] The methodology used for the dextran samples was similar to that described above in Example 1. The cell isolation and culture were similar, except that the cell density was 400,000 cells per well and the sample dilution used in the ELISA was 1 in 10. The IL-6 ELISA was different in that it used plates coated with Clone16 monoclonal antibody (for capture of IL-6) and a sheep polyclonal antibody conjugated to horse-radish peroxidase as the detecting antibody. The ELISA is used in the whole blood/IL-6 test (NIBSC) and the PBMC/IL-6 test (Novartis) as described in the Hoffmann et al. paper, 2005.

[0088] Figure 9 illustrates comparative results for the Extraneal[®] negative control sample and the Extraneal[®] positive control sample, and for dextran negative control sample and dextran positive control sample. It can be seen that the pyrogen test of the invention can readily discriminate between these positive and negative controls. The test was carried out, in quadruplicate, according to the protocol described above, with blood from a single donor. Values are means $\pm$ standard error of the means of four replicate wells.

[0089] Figure 10 illustrates comparative results for the Extraneal[®] negative control sample and the Extraneal[®] positive control sample. It can be seen that the pyrogen test of the invention can readily discriminate between these positive and negative controls. The test was carried out, in quadruplicate, according to the protocol described above, with blood from a single donor. Values are means $\pm$ standard error of the means of four replicate wells. Note that low cell density was sufficient for discrimination of positive from negative Extraneal controls when whole blood was the monocyte-containing reagent and round-bottomed polypropylene wells were used.

Example 4 - Pyrogen Test of the Invention: Comparative Results for Polypropylene Plates vs. Polystyrene Plates and IL-6 vs. IL-1 β for a Single Donor

[0090] The test samples were prepared according to the method of Example 1, except that cell densities of 1 million cells per well were used, some samples were subjected to IL-1 β readout, and some samples were placed in polystyrene microtiter plates with flat-bottomed wells. Figure 11A shows that IL-6 responses to positive controls were clearly distinguished from negative controls for tests conducted in polypropylene plates, but were not distinguished for those in polystyrene plates. Values are means $\pm$ standard error of the means of four replicate wells. Figure 11B shows that IL-1 β responses to positive controls were clearly distinguished from negative controls for tests conducted in polypropylene plates, but were not distinguished for those in polystyrene plates. However, the magnitude of the response in Figure 11B was much less than that of Figure 11A, indicating that IL-1 β is a poor readout as compared to IL-6. Values are means $\pm$ standard error of the means of four replicate wells.

Example 5 - Pyrogen Test of the Invention: Comparative Results for Polypropylene Plates vs. Polystyrene Plates for Multiple Donors

[0091] The test samples were prepared according to the method of Example 1, except that cell densities of 0.88 and 1 million cells per well were used, three donors were used, some samples were placed in polystyrene microtiter plates with flat-bottomed wells, and the IL-6 ELISA used plates coated with Clone16 monoclonal antibody and a sheep polyclonal antibody conjugated to horse-radish peroxidase as the detecting antibody as described in the Hoffmann et al. paper, 2005. Figures 12A and 12B illustrate the IL-6 response for polypropylene microtiter plates with round-

bottomed wells and polystyrene microtiter plates with flat-bottomed wells for PBMC cell density of 0.88 million cells per well for donor A, respectively. For donor A, the pyrogen test did not distinguish between positive and negative controls when the polystyrene plates were used, but did distinguish between these controls when polypropylene plates were used. Figures 13A and 13B illustrate the IL-6 response for polypropylene microtiter plates with round-bottomed wells and polystyrene microtiter plates with flat-bottomed wells for PBMC cell density of 1 million cells per well for donor B, respectively. Although both pyrogen tests distinguished between positive and negative controls for donor B, the IL-6 response for the positive control was about 6 times that of the negative control using the polypropylene plates, but only about 2 times that of the negative control using polystyrene plates. Figures 14A and 14B illustrate the IL-6 response for polypropylene microtiter plates with round-bottomed wells and polystyrene microtiter plates with flat-bottomed wells for PBMC cell density of 0.88 million cells per well for donor C, respectively. Although both pyrogen tests distinguished between positive and negative controls for donor B, the IL-6 response for the positive control was about twice as great using the polypropylene plates versus the polystyrene plates. Note that in polypropylene the response to the Extraneal[®] positive control exceeds the response to the largest dose of LPS standard, i.e. 0.4 EU/ml, whereas in polystyrene the response to the Extraneal[®] positive control is smaller than the response to the smallest dose of LPS standard, i.e. 0.1 EU/ml.

Example 6 – Comparative Pyrogen Test: IPT (Charles River Laboratories)

[0092] The methodology used in performing this test is described in the Endosafe[®]- IPT InVitro Pyrogen Test instruction sheet (commercially available from Charles River Laboratories (PIIPT10002)) using the assay procedure for whole blood stimulation using IL-1 β and polystyrene microtiter plates. Figure 15 illustrates that the IPT test failed to discriminate between Extraneal[®] and Hemoglobin positive and negative controls, though the kit responded to LPS standard and to a kit positive control of lipotechoic acid from a Gram-positive bacteria.

Example 7 – Pyrogen Test of the Invention using Cryo-preserved Cells

[0093] Cell suspension (e.g. 1 million PBMC or monocytic cells) in plasma and dimethyl sulphoxide (or in whole blood and dimethyl sulphoxide) is added to each well of a 96-well polypropylene plate with round-bottomed 250 μ L wells, which is then sealed and cryo-preserved.

[0094] On the day of the test, the plate is thawed, brought to room temperature, the seal removed and the 96-well insert pushed firmly into position. The insert has walls of polypropylene and a flat bottom that is a barrier to the passage of cells but not liquids.

[0095] The DMSO is washed away from the cells by filling the insert with fresh medium and aspirating the medium up and down to mix the solutions above and below the cell-barrier before aspirating and discarding the solution above the cell-barrier. By repeating this washing step 5 times, the cells are washed essentially free of DMSO and are retained in a known volume of fresh medium.

[0096] Test sample or standard and more fresh medium are added to the insert and, by aspirating this solution up and down to mix the solutions above and below the cell-barrier, pyrogen in the sample or (pyrogen) standard is allowed access to the cells.

[0097] The plate is incubated at $37\pm1^{\circ}\text{C}$, in 5% carbon dioxide gas in humidified air for 16-24 hours. During the incubation, the cells settle allowing cells to contact each other which facilitates pyrogen-stimulated IL-6 release. At the end of the incubation period, the solutions above and below the cell-barrier are thoroughly mixed by aspirating the solution above the cell-barrier up and down, before an aliquot of cell-conditioned medium is taken for assay of IL-6.

[0098] Cryo-preserved PBMCs are advantageous because they can be easily shipped on dry ice throughout the world. Unlike polystyrene, polypropylene withstands liquid nitrogen without cracking. On arrival, the PBMCs need only to be thawed and washed free of the DMSO to be ready for use in a test, in conjunction with the provided plate insert. By shipping the cells at the optimum number per well and using the cells in conjunction with the plate insert, an improved test kit is provided to the end-user. With a conventional kit, cells are shipped in a tube and, once thawed, have to be washed by centrifugation, which pellets the cells, allowing them to be dispersed in clean medium. Usually cells are washed two or three times in this way. Then the cells have to be counted and re-suspended at the required cell density before they can be dispensed into wells. The pyrogen test of the present invention is less labor intensive, less time-consuming and far less traumatic to the cells as compared to conventional tests which can result in cell loss, activation and cell death.



[0099] When introducing elements of the present invention or the preferred embodiments(s) thereof, the articles "a", "an", "the" and "said" are intended to mean that there are one or more of the elements. The terms "comprising", "including" and "having" are intended to be inclusive and mean that there may be additional elements other than the listed elements. As various changes could be made in the above methods and compositions without departing from the scope of the invention, it is intended that all matter contained in the above description shall be interpreted as illustrative and not in a limiting sense.

7f

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of detecting non-endotoxin pyrogens in a sample comprising the steps of:

combining a monocyte-containing reagent and the sample to be tested in a first assay system which comprises at least one surface comprising polypropylene, wherein the monocyte-containing reagent comprises peripheral blood mononuclear cells or monocytic cell line cells, is in contact with said surface, and is present in said assay system at a high cell density;

incubating the monocyte-containing reagent and the sample, wherein the monocyte-containing reagent produces a cytokine or an endogenous mediator of the inflammatory response;

transferring the contents of the first assay system to a second assay system which comprises at least one surface treated with an antibody to a cytokine or an endogenous mediator of the inflammatory response; and

assaying the second assay system for the presence of cytokine or endogenous mediator bound to the antibody on the surface; whereby an elevated level of cytokine or endogenous mediator bound to the surface indicates the presence of pyrogens in the sample tested.

2. A method of detecting non-endotoxin pyrogens in a parenterally administered medical product comprising the steps of:

combining a monocyte-containing reagent and the medical product to be tested in a first assay system which comprises at least one surface comprising polypropylene, wherein the monocyte-containing reagent comprises whole blood and is in contact with said surface;

incubating the monocyte-containing reagent and the medical product, wherein the monocyte-containing reagent produces IL-6;

transferring the contents of the first assay system to a second assay system which comprises at least one surface treated with an antibody to IL-6; and

assaying the second assay system for the presence of IL-6 bound to the antibody on the surface; whereby an elevated level of IL-6 bound to the surface indicates the presence of pyrogens in the medical product tested.

+2

3. A method of detecting non-endotoxin pyrogens in a parenterally administered medical product comprising the steps of:

combining a monocyte-containing reagent and the medical product to be tested in an assay system which comprises at least one surface comprising polypropylene and at least one surface treated with an antibody to IL-6, wherein the monocyte-containing reagent comprises whole blood and is in contact with said surface comprising polypropylene; and

assaying the assay system for the presence of IL-6 bound to the antibody on the surface; whereby an elevated level of IL-6 bound to the surface indicates the presence of pyrogens in the medical product tested.

4. A method of culturing cells contained within a monocyte-containing reagent for use in a non-endotoxin pyrogen assay comprising the step of:

combining the monocyte-containing reagent and a sample to be tested in an assay system which comprises at least one surface comprising polypropylene, wherein the monocyte-containing reagent comprises peripheral blood mononuclear cells or monocytic cell line cells, is in contact with said surface, and is present in said assay system at a high cell density.

5. The method of claim 4 wherein the assay system comprises at least one microtiter well shaped such that the monocyte-containing reagent is concentrated as compared to a flat-bottomed microtiter well, at least one surface of said well comprises polypropylene, and the monocyte-containing reagent is present in such well at a high cell density.

6. The method of claim 1 or 2 wherein at least one of the first and second assay system includes at least one microtiter well, and the surface(s) is at least a portion of the interior of the microtiter well.

7. The method of claim 3 or 4 wherein the assay system includes at least one microtiter well, and the surface(s) is at least a portion of the interior of the microtiter well.

53

8. The method of any one of claims 5-7 wherein the well is shaped such that the monocyte-containing reagent is concentrated to provide greater cell to cell contact as compared to a flat-bottomed microtiter well.

9. The method of any one of claims 5-7 wherein the microtiter well comprises an open top, an upper region extending downwardly from the open top, and a bottom wall tapering in diameter from a location above the lowest point to the lowest point.

5 10. The method of any one of claims 5-7 wherein the microtiter well comprises an open top, an upper region extending downwardly from the open top having a top end and a bottom end, and a bottom region having a top end and a lowest point, the bottom region extending from the bottom end of the upper region and tapering in diameter more rapidly than the upper region from the top end of the bottom region toward the lowest point.

11. The method of claim 9 wherein the bottom wall of said microtiter well is non-planar, curved, parabolic or downwardly extending.

12. The method of any one of claims 5-7 wherein the sides of said microtiter well are sloped inward.

13. The method of claim 5 wherein the assay system comprises at least one surface treated with an antibody to a cytokine, and the surface on which the antibody is applied is at least a portion of the interior of said microtiter well.

14. The method of claim 13 wherein the antibody is an antibody to an endogenous mediator of the inflammatory response.

15. The method of claim 14 wherein the endogenous mediator is endothelin.

16. The method of claim 5 further comprising the step of assaying the assay system for the presence of cytokine or endogenous mediator bound to the antibody on the surface; whereby an elevated level of cytokine or endogenous mediator bound to the surface indicates the presence of pyrogens in the sample tested.

17. The method of any one of claims 1, 13 or 16 wherein the cytokine is selected from the group consisting of interleukin-1 (IL-1), interleukin-1ra (IL-1ra), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and tumor necrosis factor- α (TNF- α).

18. The method of claim 17 wherein the cytokine is IL-6.

19. The method of any one of claims 1-18 wherein the antibody is a polyclonal antibody.

20. The method of any one of claims 1-18 wherein the antibody is a monoclonal antibody.

21. The method of any one of claim 1-20 wherein the assay system(s) is a colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), a radio-labeled immunoassay, or a fluorescence-labeled immunoassay.

22. The method of any one of claims 1 or 4-21 wherein the monocytic cell line comprises a human monocytic cell line.

23. The method of claim 22 wherein the monocytic cell line is MONOMAC-6, THP-1, or 28SC.

24. The method of any one of claims 1 and 4-21 wherein the monocytic cell line comprises a cell line having endogenous CD14 and Toll-like receptors or which has been transfected with CD14 and/or Toll-like receptors and/or reporter genes for inflammatory or pyrogenic mediators.

25. The method of any one of claims 1 and 4-24 wherein the sample is a parenterally administered medical product.

26. The method of any one of claims 2, 3 and 25 wherein the parenterally administered medical product is selected from the group consisting of a blood product, dialysis solution, vaccine, and plasma expander.

75

27. The method of any one of claims 1 and 4-26 wherein the monocyte-containing reagent is present in said assay system at a cell density of at least about 250,000, 500,000, 600,000, 700,000, 800,000, 900,000, 1,000,000, 1,100,000, 1,200,000, 1,300,000, 1,400,000, 1,500,000, 1,600,000, 1,700,000, 1,800,000, 1,900,000 or 2,000,000 cells per well.

28. The method of any one of claims 1 and 4-27 wherein the peripheral blood mononuclear cells comprise human peripheral blood mononuclear cells:

29. The method of any one of claims 2, 3, 6-12, 19-21 and 26 wherein the monocyte-containing reagent further comprises a diluent.

30. The method of claim 29 wherein the diluent is RPMI media.

31. The method of any one of claims 2, 3, 6-12, 19-21, 26, 29 and 30 wherein the monocyte-containing reagent further comprises an anticoagulant .

32. The method of any one of claims 2, 3, 6-12, 19-21, 26 and 29-31 wherein the whole blood comprises human whole blood.

33. The method of any one of claims 2, 3, 6-12, 19-21, 26 and 29-31 wherein the monocyte-containing reagent is present in said assay system at a cell density of greater than about 100,000, 200,000, 210,000, 220,000, 230,000, 240,000, 250,000, 260,000, 270,000, 280,000, 290,000, 300,000, 310,000, 320,000, 330,000, 340,000, 350,000, 360,000, 370,000, 380,000, 390,000 or 400,000 peripheral blood mononuclear cells per well.

34. A diagnostic kit comprising:
a microtiter plate comprising a plurality of microtiter wells shaped such that cells contained in each well are concentrated as compared to a flat-bottomed microtiter well, a surface of said well comprising polypropylene; and
a cryopreserved monocyte-containing reagent which is contained in the wells of said plate, wherein the monocyte-containing reagent comprises cryopreserved peripheral blood mononuclear cells or cryopreserved monocytic cell line cells, is in

76

contact with the surfaces of said wells, and is present in said well at a high cell density.

35. A diagnostic kit comprising:

an assay system for detecting non-endotoxin pyrogens in a parenterally administered medical product, said assay system comprising a microtiter plate comprising a plurality of microtiter wells shaped such that cells contained in each well are concentrated as compared to a flat-bottomed microtiter well, a surface of said well comprising polypropylene;

a cryopreserved monocyte-containing reagent which is contained in the wells of said plate, wherein the monocyte-containing reagent comprises cryopreserved whole blood and is in contact with the surfaces of said wells; and
an antibody to IL-6.

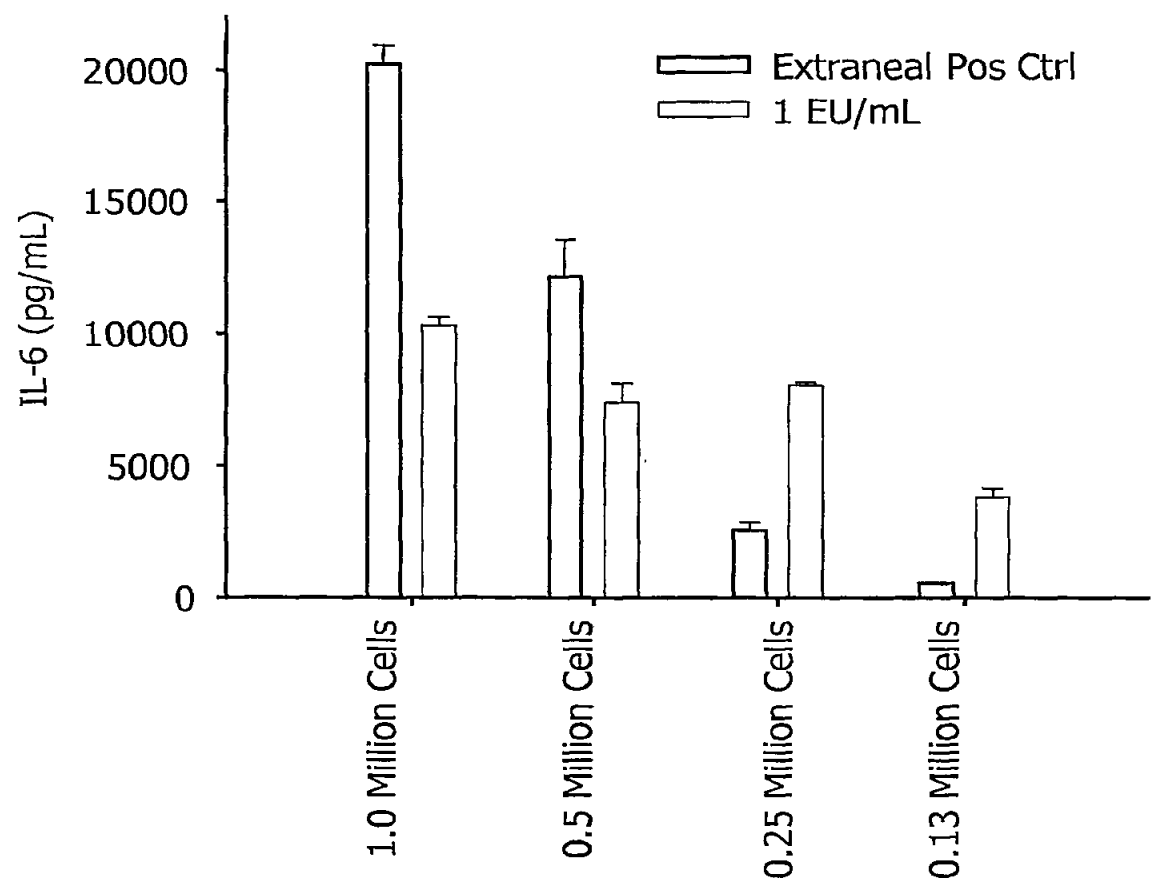
36. The kit of claim 34 or 35 wherein said well further comprises a barrier which is impervious to monocytes.

37. The kit of claim 36 wherein said barrier comprises a membrane, a grid, a sieve, or a sifter.

77

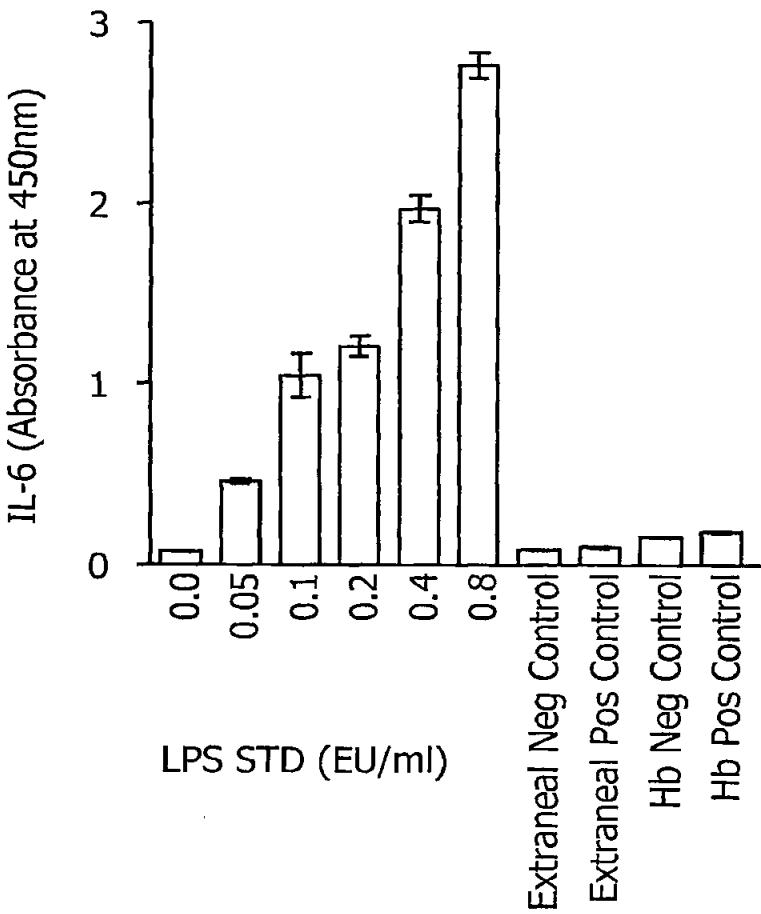
1/16

FIG. 1



2/16

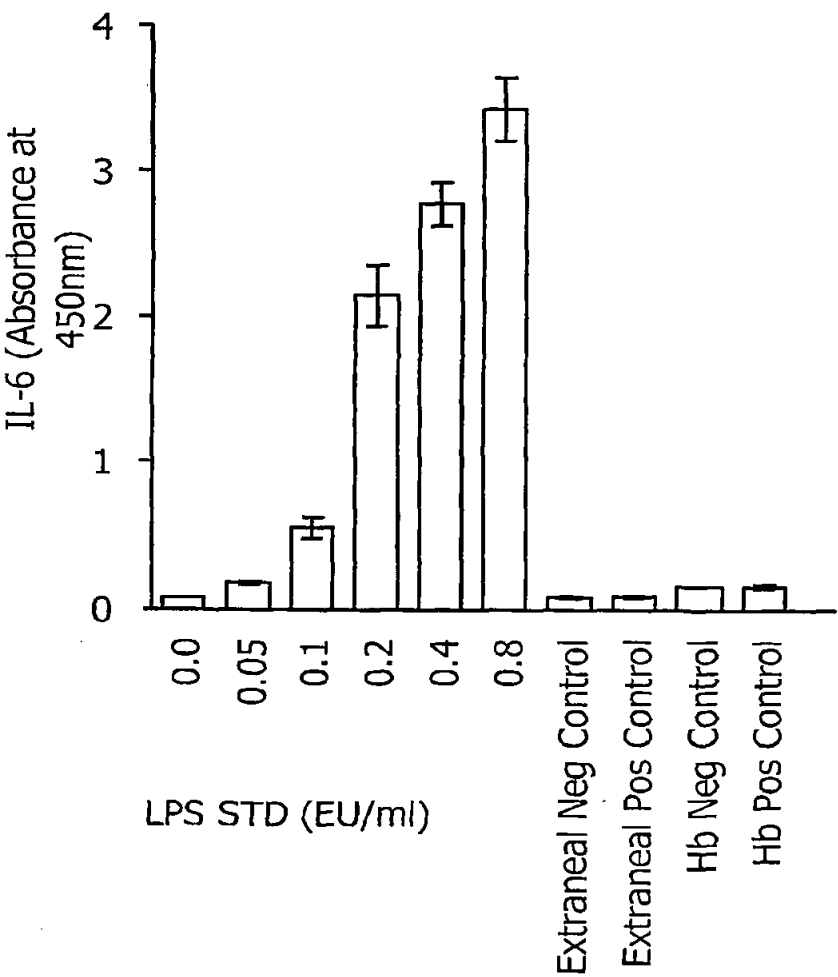
FIG. 2



29

3/16

FIG. 3



4/16

FIG. 4

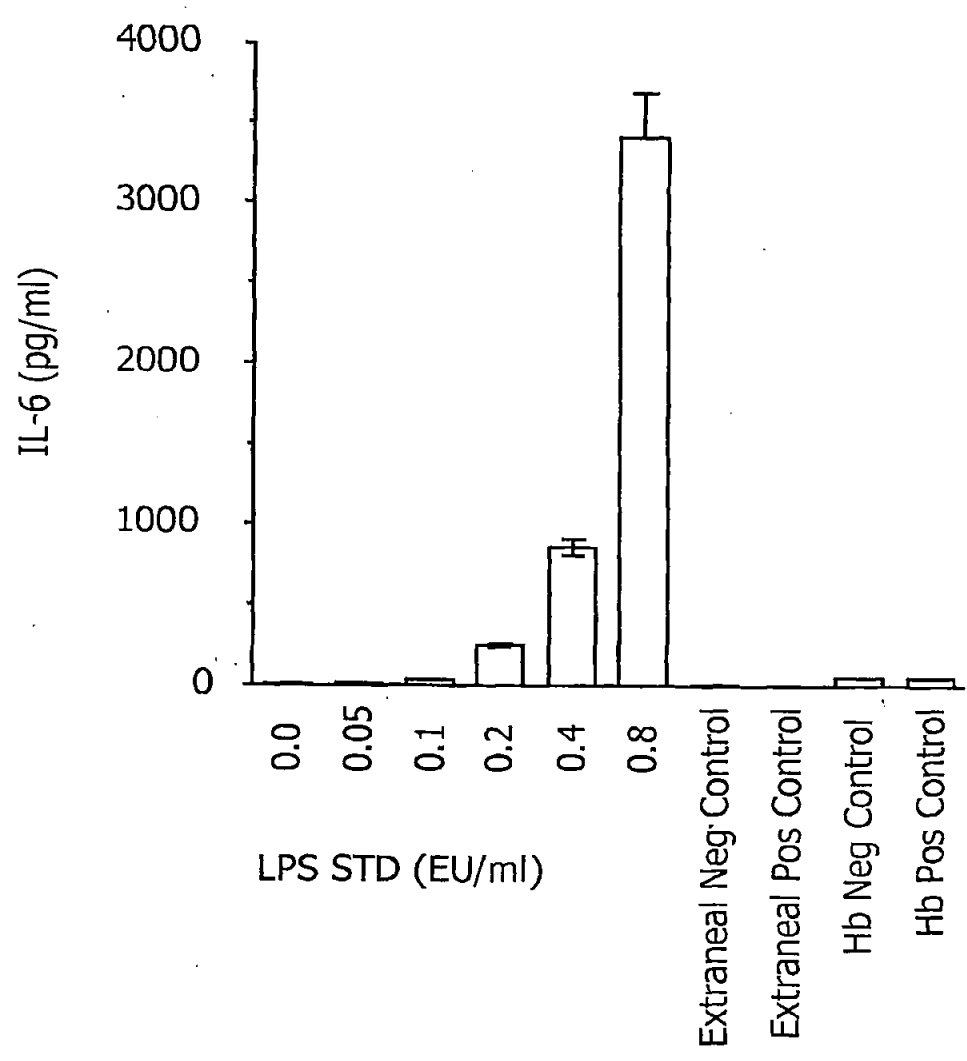
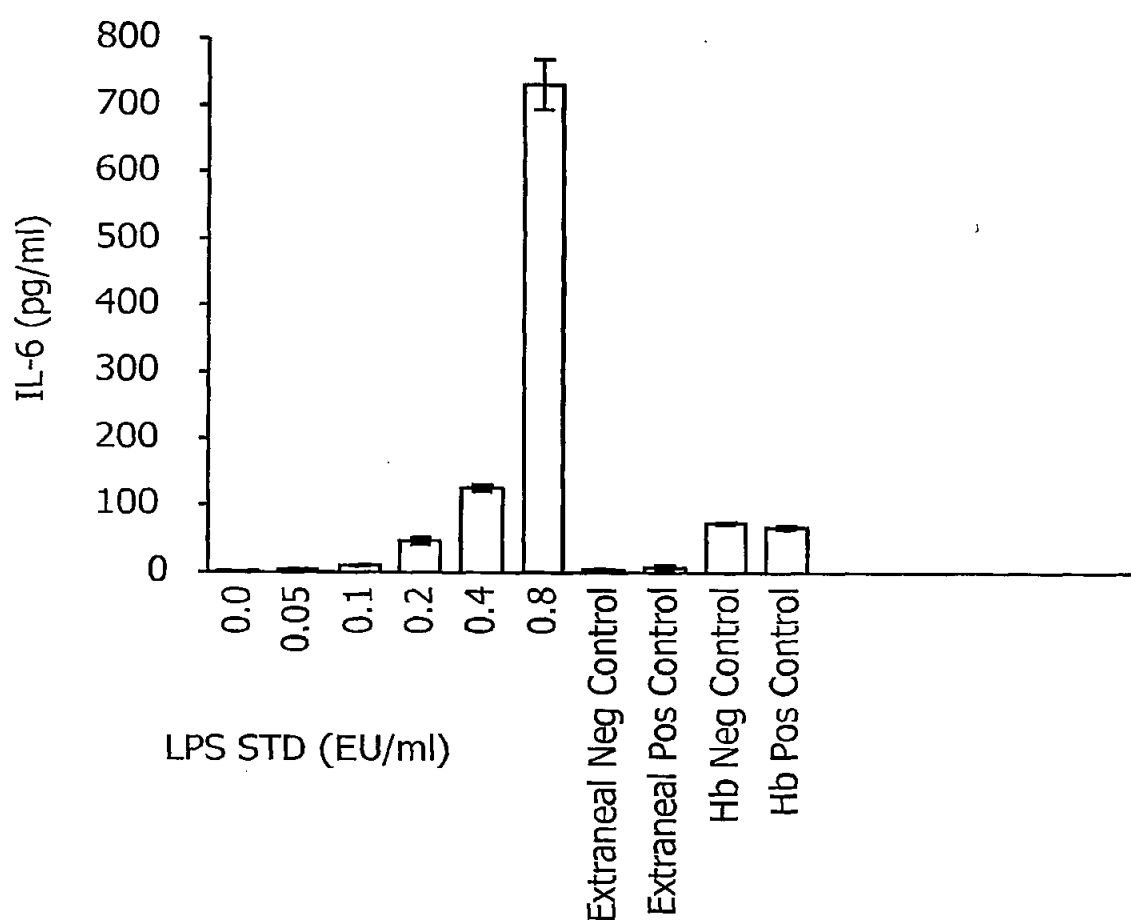
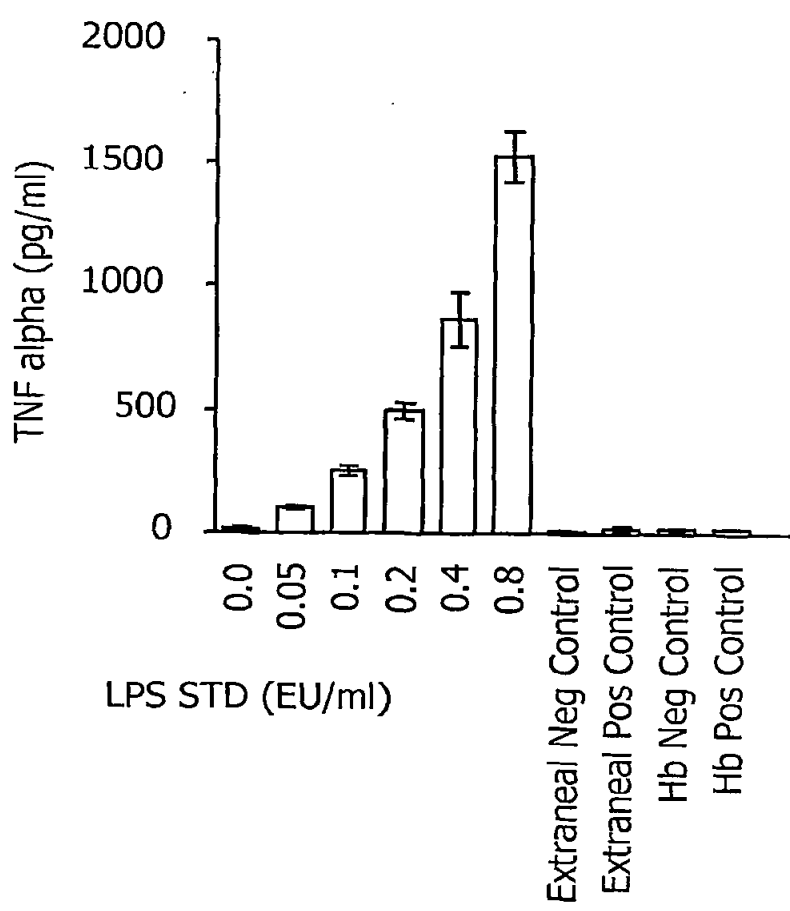


FIG. 5



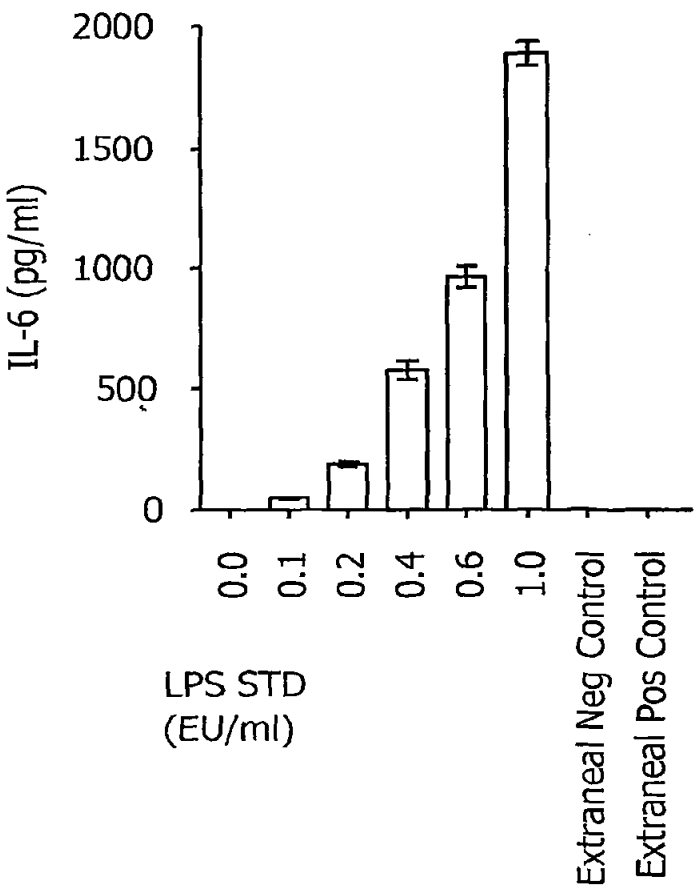
6/16

FIG. 6



7/16

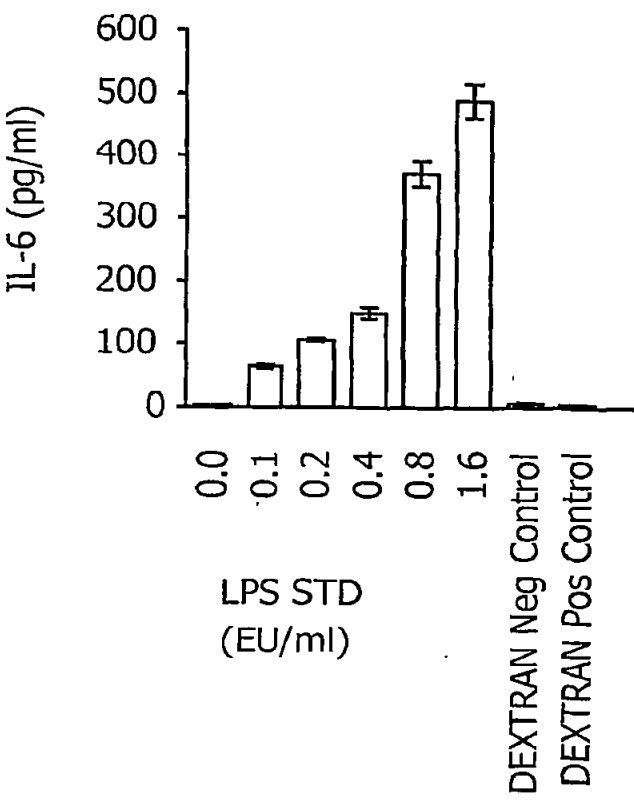
FIG. 7



84

8/16

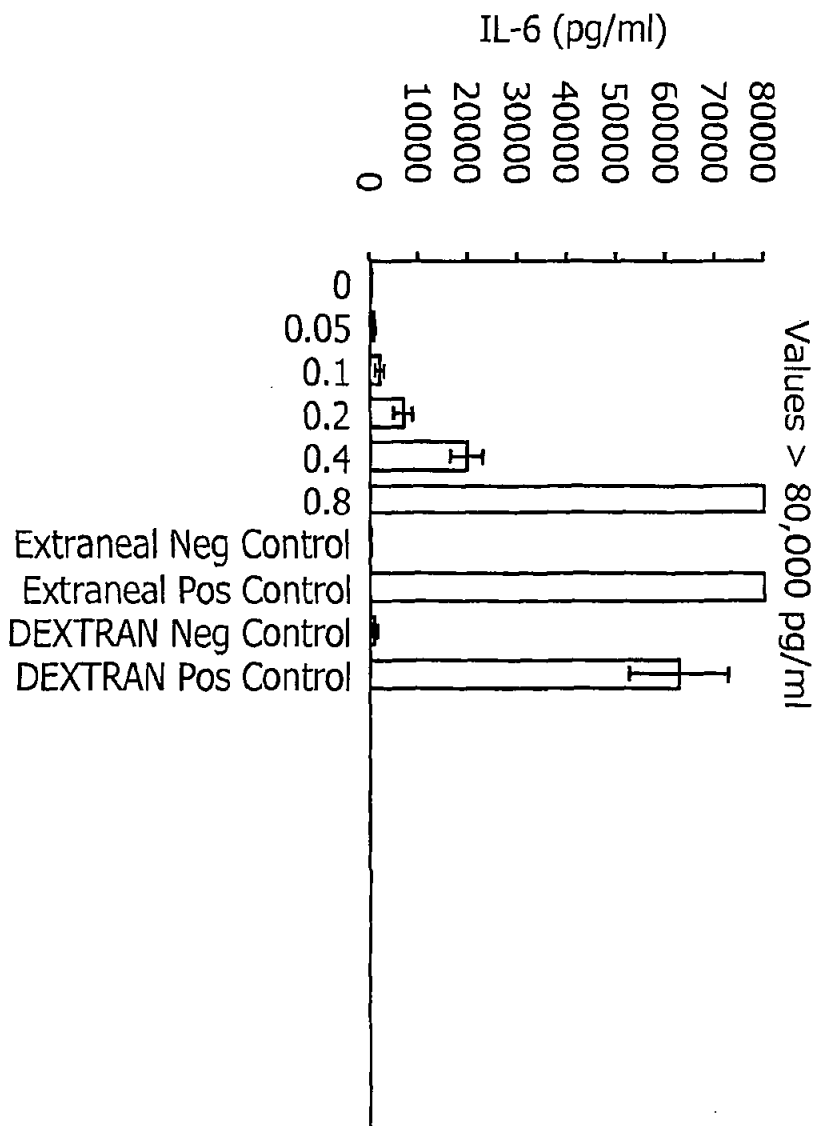
FIG. 8



85

9/16

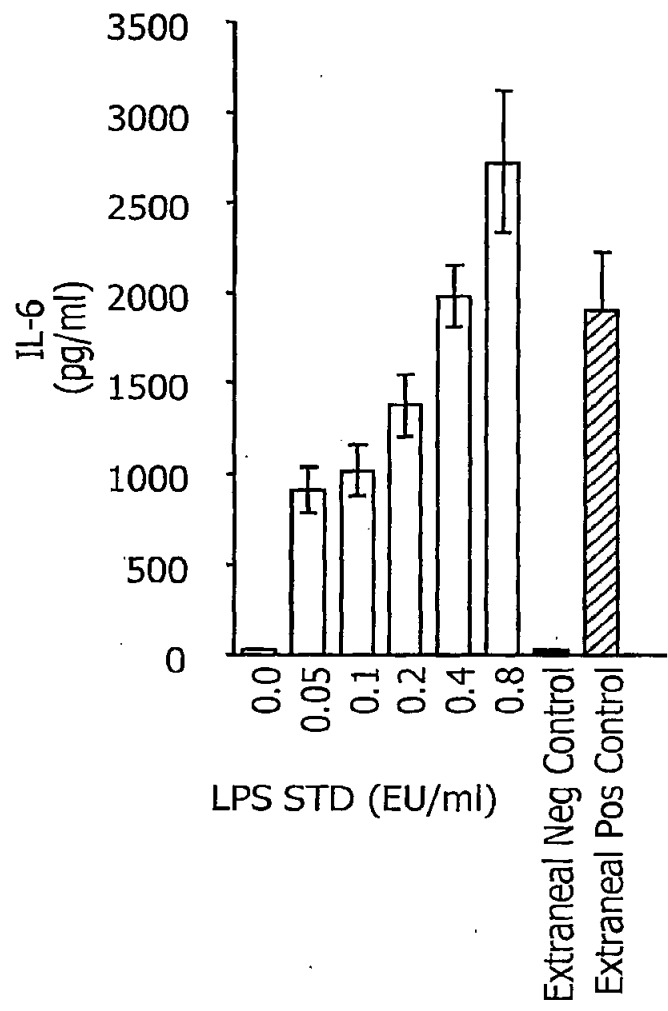
FIG. 9



86

10/16

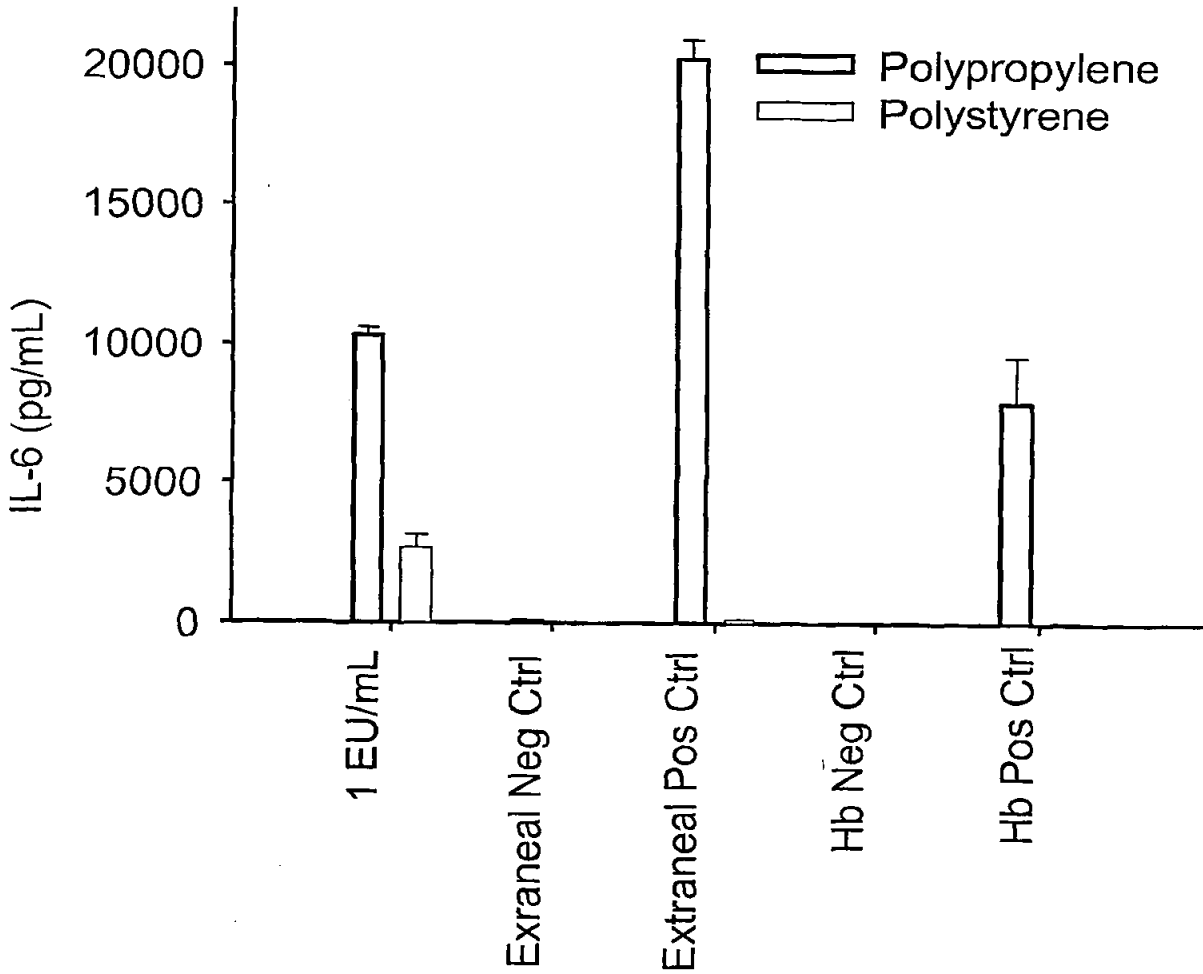
FIG. 10



87

11/16

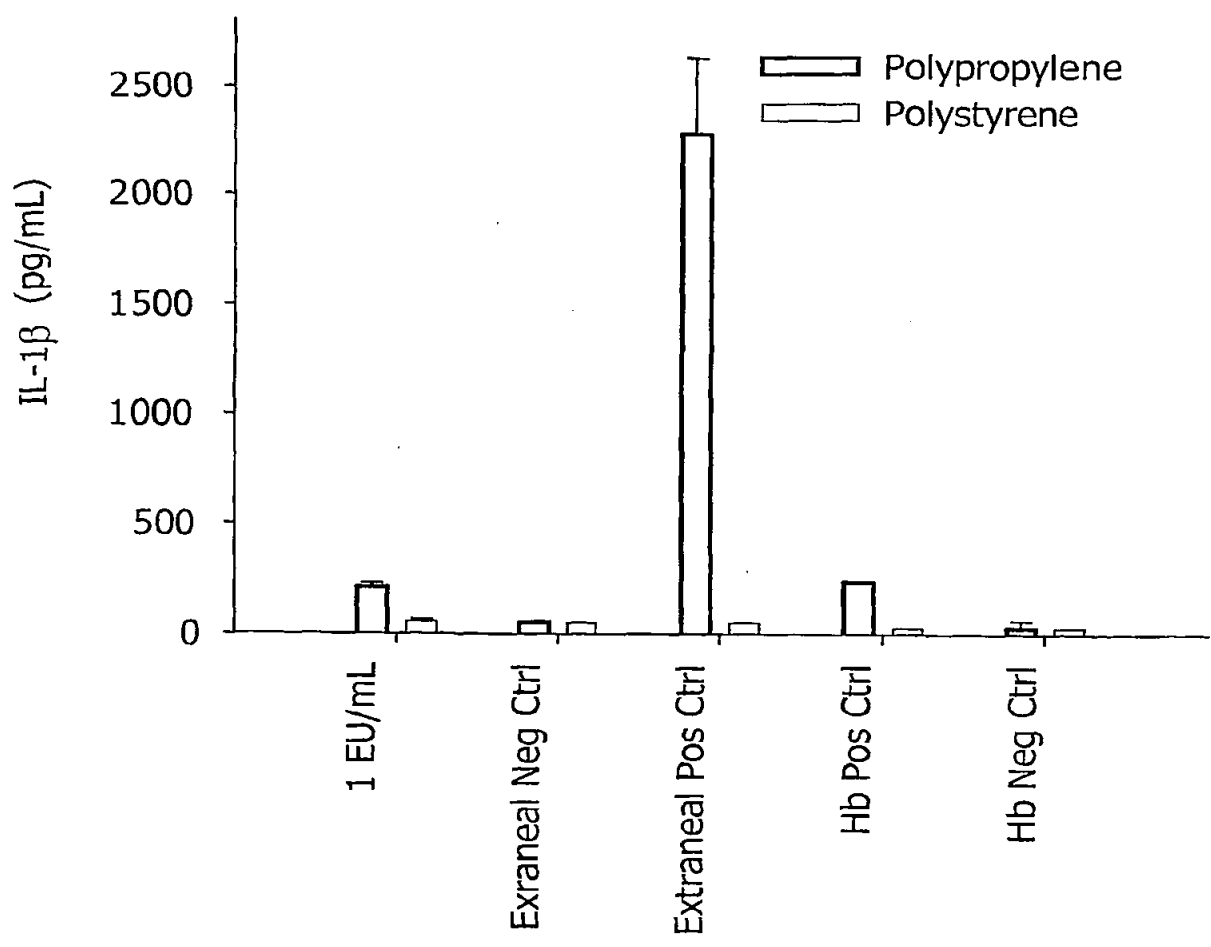
FIG. 11A



88

12/16

FIG. 11B



13/16

FIG. 12A

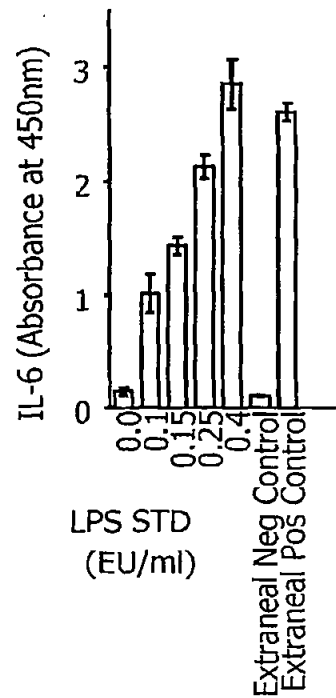
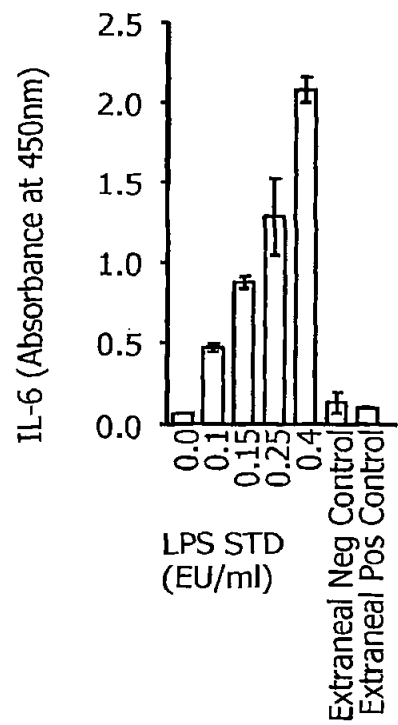


FIG. 12B



14/16

FIG. 13A

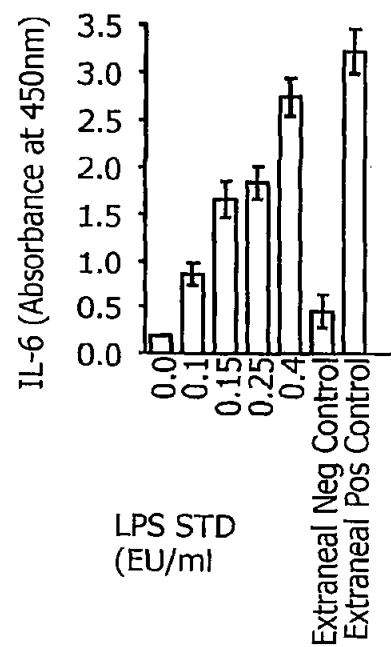
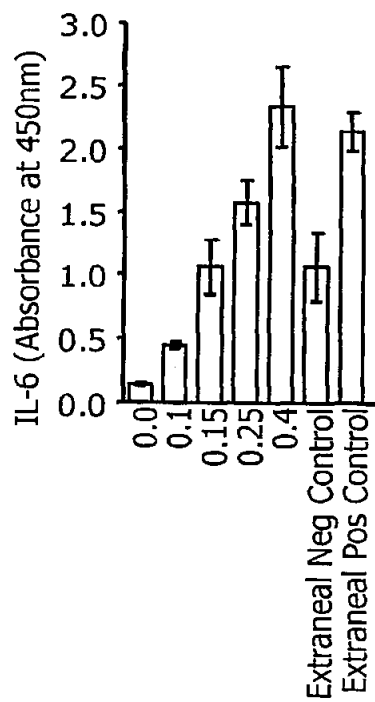


FIG. 13B



15/16

FIG. 14A

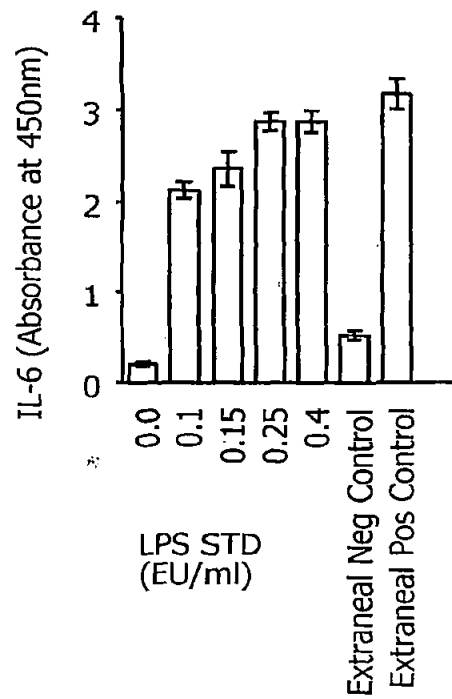
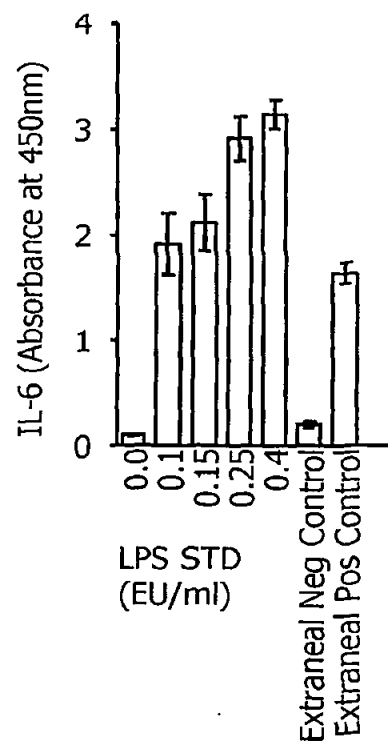
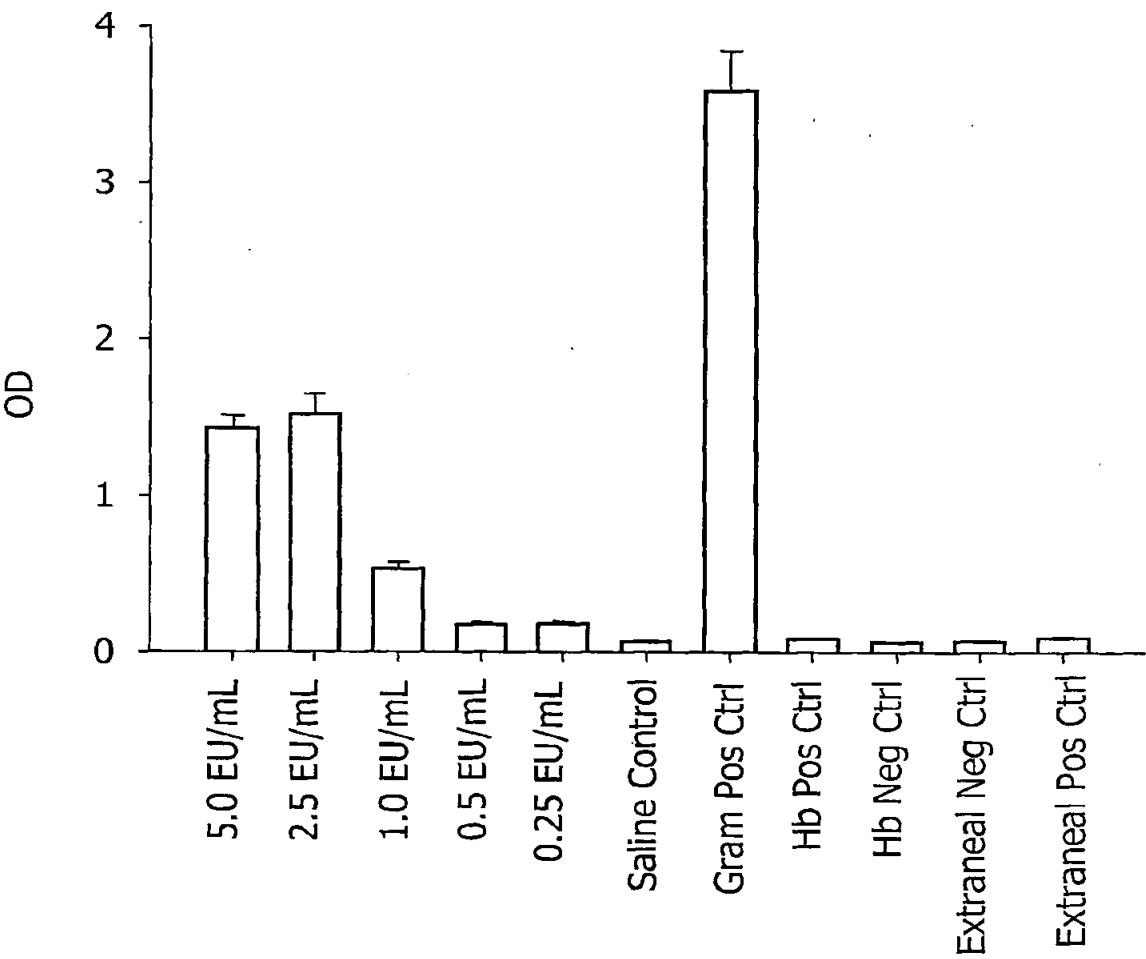


FIG. 14B



16/16

FIG. 15



PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITO MEJORADA PARA
TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR
CONTAMINANTES PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN
PRODUCTOS MÉDICOS

5

Campo de la Invención

La presente invención se refiere de manera general a una prueba de activación de monocitos mejorada que tiene una mejor capacidad para detectar pirógenos sin endotoxina en
10 productos médicos, en donde una muestra se incuba con un reactivo que contiene monocitos en un sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que comprende polipropileno. La presente invención también se refiere a sistemas de ensayo para utilizarse en estas pruebas, los cuales
15 incluyen al menos un depósito de microtitulación que tiene al menos una superficie interior que comprende polipropileno y que tiene una forma tal que el reactivo que contiene monocitos se concentra en el depósito para proporcionar un mayor contacto célula con célula. La presente invención también se
20 refiere a un equipo de diagnóstico que se puede utilizar para probar la presencia de pirógenos sin endotoxina en una muestra.

Antecedentes de la Invención

Cuando ciertos compuestos químicos o biológicos se
25 ponen en contacto con el sistema circulatorio de humanos u otros mamíferos, originan una respuesta sistémica conocida como respuesta inflamatoria o inflamación. La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa para proteger al cuerpo de infección y/o lesión; la inflamación incrementa el
30 flujo sanguíneo al sitio de inyección o lesión, llevando fluidos, proteínas y glóbulos blancos (leucocitos) necesarios para

ayudar en el proceso de curación. Por ejemplo, un síntoma asociado con la respuesta inflamatoria es una elevación en la temperatura corporal o fiebre, que funciona como un mecanismo de defensa a patógenos que originan un sobre-calentamiento.

5 La respuesta inflamatoria puede estar asociada con una variedad de síntomas "tipo flu" que incluyen fiebre, escalofríos, fatiga, dolor de cabeza, pérdida de apetito y rigidez muscular. Un compuesto químico o biológico que dispara la fiebre ha sido referido históricamente como un pirógeno o un compuesto
10 "pirogénico", que se refiere a la respuesta con fiebre que dichos compuestos pueden originar. Sin embargo, dichos compuestos químicos o biológicos, generalmente son pro-inflamatorios y pueden o no originar fiebre como parte de la respuesta inflamatoria que pueden originar.

15 En algunos casos, dependiendo de la sensibilidad del individuo y el tipo de concentración de pirógenos al que está expuesto el individuo, un individuo puede desarrollar síntomas tipo shock que ponen en riesgo la vida después de un pirógeno. Los productos médicos que pueden ser inhalados, inyectados, o
20 infundidos y los aparatos médicos tales como membranas o materiales implantados, ponen un riesgo particular de pirogenicidad. Incluso los nutrientes pueden representar un riesgo de pirogenicidad. Los pirógenos contenidos en productos médicos y nutrientes son referidos como pirógenos exógenos;
25 en contraste, los pirógenos endógenos son compuestos mensajeros del sistema inmune que transmiten una respuesta inflamatoria individual a los pirógenos exógenos. Además de la naturaleza pirogénica de un producto por si mismo o sub-productos de sub-producción, la contaminación del producto con
30 frecuencia puede originar pirogenicidad. La pirogenicidad debido a contaminación de un producto puede ser originada por

cualquiera de un grupo diverso de pirógenos derivados de bacterias, virus, hongos o incluso del huésped. Este problema puede persistir incluso si el producto es "esterilizado" mediante calor o métodos químicos; un compuesto pirogénico
5 comúnmente encontrado, endotoxina bacteriana (que consiste en gran parte de lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de bacteria Gram-negativa) que puede permanecer después de que exterminan las bacterias. Por lo tanto, las pruebas de pirógeno derivados farmacéuticos, nutrientes y productos médicos para
10 aplicación parenteral es necesario con el objeto de asegurar la seguridad de dichos productos.

Normalmente los productos que actúan como un pirógeno, realizan esto estimulando la producción de pirógenos endógenos, tales como prostaglandinas y citocinas, pro-
15 inflamatorias, en monocitos después del contacto con tejido, células o fluidos corporales. Son estos pirógenos producidos en forma endógena los que transmiten la respuesta inflamatoria en el organismo afectado. Lo más importante y bien conocido de estos pirógenos endógenos, son las citocinas, interleucina-1
20 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y factor de necrosis de tumor (TNF) y la prostaglandina transmisora de lípidos de bajo peso molecular E2 (PGE_2). Estos compuestos son ensayados en forma rutinaria mediante ensayos ELISA, o ensayos inmunoabsorbentes enlazados por enzimas (para IL-1,
25 IL-6, o TNF), y EIA, o inmunoensayo de enzima (para PGE_2).

Con el objeto de evitar una reacción pirogénica y confirmar la seguridad de cualquier fármaco o producto farmacéutico administrado en forma parenteral, la contaminación pirogénica debe ser monitoreada para identificar
30 lotes individuales que están contaminados con contaminantes bacterianos. Dos métodos de la Farmacopea a base de

animales, la prueba de lisado de amebocito *Limulus* (LAL), también referido como prueba de endotoxinas bacterianas (BET), y la prueba de pirógeno de conejo, son utilizadas de manera rutinaria normalmente para monitorear contaminación de
5 pirógenos en productos farmacéuticos producidos en masa.

La prueba de conejo es una prueba *in vivo* que consiste en inyectar un número estadísticamente significativo de conejo con el compuesto de muestra y observar el surgimiento promedio en la temperatura corporal provocada en los animales de prueba.
10 Aunque la prueba de conejo responde a un amplio espectro de agentes pirogénicos, incluyendo pirógenos sin endotoxinaa, la prueba de conejo tiene una sensibilidad relativamente baja (ng endotoxina/ml) en comparación con otras pruebas de pirógenos (pg endotoxina/ml para la prueba LAL). Además, la correlación
15 de respuestas pirogénicas a compuestos entre especies, es cuando mucho, un aproximado. Se ha documentado, por ejemplo, que la dosis de la endotoxina bacteriana que provoca una respuesta pirogénica varía tanto como 10,000 veces entre las especies. La insensibilidad relativa, resultados cuantitativos
20 deficientes, variabilidad entre especies de conejos y aspectos éticos implicados en las pruebas con animales, han desfavorecido la prueba con conejos en los últimos años.

En contraste con la prueba de conejos, que detecta un amplio rango de pirógenos, la prueba LAL únicamente detecta
25 pirógenos de endotoxina. La endotoxina bacteriana, por ejemplo, es lipopolisacárido (LPS), que viene de la pared celular de bacterias Gram-negativa, es uno de los compuestos pirogénicos mejor descritos (Moltz y asociados, Neurosci. Biobehav. Rev., 1993, 17, 237-269; Tilders y asociados,
30 Psychoneuroendocrinology, 1994, 19, 209-232; Rothwell, Crit. Rev. Neurobiol., 1994, 8, 1-10; Zeisberger y Roth,

Neuropsychobiology, 1993, 28, 106-109). Por consiguiente se consideró que era generalmente útil reemplazar experimentos con conejos costosos y tardados con una prueba LAL directa para endotoxina bacteriana. Este método tiene limitaciones obvias. La prueba LAL es una prueba *in vitro* muy sensible; sin embargo, únicamente detecta endotoxinas de bacteria Gram-negativa y proporciona resultados negativos falsos con ciertos productos que aún pueden estimular monocitos para elaborar citocinas pirogénicas. La prueba LAL también es susceptible a interferencia, por ejemplo, a través de altos niveles de proteína de sustancias de prueba o mediante glucanos (Roslansky y Novitsky, J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 2477; Fennrich y asociados, Dev. Biol. Stand., 1999, 101, 131). Por otra parte, la prueba Limulus es tan sensible que puede estar fácilmente propensa a resultados positivos falsos debido a impurezas que no son relevantes para la calidad del producto (Fujiwara y asociados, Yakugaku Zasshi, 1990, 110, 332-340).

Por lo tanto, existe la necesidad de un sistema de pruebas a base de no animales que esté caracterizado por alta sensibilidad, alta especificidad y la capacidad de detectar un amplio rango de pirógenos. Con este proyecto y esta comprensión mejorada de la respuesta inflamatoria humana, los sistemas de prueba con base en la activación *in vitro* de monocitos humanos han sido desarrollados. Hace casi 20 años, los investigadores utilizaban células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para detectar endotoxina monitoreando la liberación de citocinas pirogénicas. (Dinarelli y asociados, J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 323; Duff y Atkins, J. Immunol. Methods, 1982, 52, 323). Desde entonces, se han desarrollado varios diferentes sistemas de prueba que utilizan diferentes fuentes de monocitos humanos, incluyendo sangre completa

periférica humana (WB), PBMCs, o líneas celulares monolíticas tales como MONOMAC-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock y asociados, Int. J. Cancer, 1988, 41, 456) o THP-1 (Tsuchiya y asociados, Int. J. Cancer, 1980, 26, 171), y varias lecturas, incluyendo

5 factor alfa de necrosis de tumor de citocinas pirogénicas, TNF- α , IL-6, IL-1/3, y la neopterinina de metabolito no pirogénica (Hartung y asociados, The Report y Recommendations of ECVAM Workshop 43, 2001, 29, 99; Poole y Gaines Das. Eur J Parenteral Sciences, 2001, 6, 63; Poole y asociados, J. Immunol. Methods, 2003, 274, 209; Gaines Das y asociados, J. Immunol. Methods, 2004, 288, 165). Recientemente, en un estudio Europeo de colaboración, se evaluaron seis de las pruebas de activación de monocitos más prominentes, utilizando cada una diferente combinación de las fuentes celulares y

10 lecturas antes mencionadas, con respecto a la capacidad de detectar endotoxina en productos médicos ajustados con varias concentraciones de endotoxina pura.

En cinco de las seis pruebas, las células fueron cultivadas en placas de poliestireno de 96 depósitos con depósitos de

20 fondo plano (Hoffmann y asociados, J. Immunol. Methods, 2005, 298, 161). En la sexta prueba, con base en las publicaciones de (based on Fennrich y asociados, Dev. Biol. Stand., 1999; Fennrich y asociados, ALTEX, 1999; Hartung y asociados, 2001), se utilizaron tubos centrífugos de Eppendorf (1.2 ml)

25 elaborados de poliestireno, con fondos cónicos para la mayor parte de la evaluación, y en otra parte del estudio, se sustituyeron los tubos de polipropileno (1.5 ml), con fondos redondos, por los tubos de polietileno de Charles River Laboratories, el fabricante del equipo de prueba Endosafe® In

30 vitro Pyrogen Test (IPT) utilizado en el estudio. Esta sustitución no reportó tener efecto significativo en la prueba, y los propios

tubos de polipropileno fueron reemplazados posteriormente con placas de 96 depósitos de poliestireno de fondo plano, cuando los laboratorios Charles River Laboratories modificaron el Endosafe® IPT para volúmenes reducidos. La fuente de
5 monocitos en esta prueba fue sangre completa y las lecturas fueron IL-1 β . La sangre completa fue incubada con varios fármacos ajustados con diferentes concentraciones de endotoxina.

Carlin y Viitanen describen una prueba de activación de
10 monocitos, con base en sangre completa o células MONOMAC-6 como la fuente de monocitos y IL-6 como la lectura, para evaluar la pirogenicidad inherente de la vacuna Infanrix, la cual contiene antígenos Gram-positivo y Gram-negativo, incluyendo varios pirógenos sin endotoxina, por ejemplo toxoide *Diphtheria*,
15 toxoide *Pertussis*, y toxoide *Tetanus* (Pharmeuropa, 2003, 15, 3, 418-423). Las células fueron cultivadas a una baja densidad celular en tubos de grado Bio-Pure de Eppendorf libres de endotoxina de composición no descrita. La pirogenicidad de la vacuna no fue el resultado de la contaminación de la vacuna
20 durante su fabricación o almacenamiento. Hartung y Wendel describen una activación de monocitos con base en sangre completa como la fuente de monocitos y IL-1 β como la lectura preferida, para detectar pirógenos de endotoxina y sin endotoxina en sus formas puras, es decir, LPS preferente de
25 *Salmonella abortus equi*, streptolysin O (SLO) procedente de *Streptococcus pyrogens*, y dipéptido de muramilo (MDP) (Hartung y Wendel, In Vitro Toxicology, 1996, 9, 4, 353-359; Patente Norteamericana No. 5,891,728). Las células fueron cultivadas en tubos de polipropileno.

30 Yamamoto y asociados describe una prueba de activación de monocitos con base en sangre completa o células de

100

diferentes líneas celulares humanas, siendo preferidas la línea celular 28SC, como la fuente de monocitos/células monolíticas y IL-6 como la lectura preferida, para detectar pirógenos de endotoxina (Jpn. J. Infect. Dis., 2003, 56, 93-100). La prueba de endotoxina se sabe que anticipa la posibilidad de una sinergia *in vivo* entre la endotoxina un fármaco parenteral, particularmente interferón, de modo que el fármaco aumenta los efectos pirogénicos de la endotoxina. Las células fueron cultivadas con cualquier endotoxina en su forma pura o una mezcla de endotoxina en su forma pura e interferón humano. Las células de la línea celular fueron cultivadas en placas de 96 depósitos de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las células de sangre fueron cultivadas en tubos de material no específico.

15 Nakagawa y asociados describe una prueba de activación de monocitos, con base en sangre completa de células MM6-CA8 (un subclon de MONOMAC-6) como la fuente de monocitos y IL-6 como la lectura preferida, para detectar pirógenos de endotoxina y sin endotoxina en sus formas puras, es decir LPS de *E. coli* O55:B5 y péptidoglican insoluble (PG) derivado de *S. aureus* (Clinical y Diagnostic Laboratory Immunol., 2002, 9, 3, 588-597). Las células MM6-CA8 fueron cultivadas en placas de 96 depósitos de poliestireno. Las células de sangre fueron cultivadas en tubos de polipropileno; los volúmenes utilizados (225 µl de sangre, 25 µl de solución de prueba, 750 µl de solución salina) excluyeron los utilizados de las placas de 96 depósitos estándar (250 µl/depósito).

Recientemente, varias fuentes indican que el polipropileno será evitados en pruebas de pirógenos. Por ejemplo, los laboratorios Charles River Laboratories recomiendan evitar el polipropileno debido a la naturaleza hidrofóbica de una

superficie de polipropileno que puede dar como resultado la absorción de endotoxinas en dicha superficie debido a los dominios hidrofóbicos asociados con el componente de líquido A de LPS (Charles River Laboratories, Endosafe Times, Sept. 5 2004). Harlan Sera-Lab, un fabricante de pruebas de bioseguridad, manifiesta que los tubos de polipropileno pueden interferir con un ensayo LAL (Harlan Sera-Lab, 2004 Catalogue). Y, la Asociación European Dialysis and Transplant Nurses Association así como la Asociación European Renal 10 Care Association recomendó evitar el polipropileno y utilizar poliestireno en pruebas de endotoxina, debido a que el poliestireno no absorbe normalmente la endotoxina (lineamientos EDTNA/ERCA).

Por lo tanto, existe la necesidad de una prueba de 15 pirógenos a base de no animales, caracterizado por alta sensibilidad, alta especificidad y la capacidad de detectar un amplio rango de contaminantes pirogénicos en productos médicos.

Breve Descripción de la Invención

20 Los solicitantes han desarrollado una prueba de pirógenos *in vitro* que es sensible y detecta contaminantes pirogénicos presentes en productos médicos. Generalmente, la presente invención se dirige a un método para detectar pirógenos sin endotoxina en una muestra, combinando monocitos, es decir, en 25 la forma de un reactivo que contiene monocitos, y la muestra que será probada en un primer sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que comprende polipropileno, de modo que los monocitos estén en contacto con la superficie. Los monocitos y la muestra se incuban de modo 30 que los monocitos produzcan una citocina o un transmisor endógeno de respuesta inflamatoria durante la incubación. Los

contenidos del primer sistema de ensayo se transfieren a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno o marcador de la respuesta inflamatoria.

5 El segundo sistema de ensayo se ensaya para la presencia de citocina o transmisor endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie. Cuando los monocitos utilizados en este método son PBMCs o células de línea celular monolítica, los monocitos están presentes en los sistemas de ensayo en una alta
10 densidad celular.

La presente invención también se dirige de manera general a un método para detectar pirógenos sin endotoxina en un producto médico administrado en forma parenteral, combinando sangre completa, como el reactivo que contiene
15 monocitos, y el producto médico que será probado en un primer sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que comprende polipropileno, de modo que la sangre esté en contacto con la superficie. La sangre y el producto médico se incuban de modo que la sangre produzca la citocina IL-6
20 durante la incubación. Los contenidos del primer sistema de ensayo son transferidos a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6. El segundo sistema de ensayo se ensaya para la presencia de IL-6 enlazado al anticuerpo en la superficie.

25 La presente invención se refiere además a un método para cultivar monocitos, es decir, en la forma de un reactivo que contiene monocitos, para utilizarse en una prueba de pirógenos sin endotoxina que combina los monocitos en una muestra que será probada en un sistema de ensayo que comprende al menos
30 una superficie que comprende polipropileno, de modo que los monocitos estén en contacto con la superficie.

La presente invención también se dirige a un método para cultivar monocitos como parte de una prueba de pirógenos sin endotoxina, combinando los monocitos y una muestra en un sistema de ensayo que comprende al menos un depósito de microtitulador formado de manera que el reactivo que contiene monocitos esté concentrado en comparación con un depósito de microtitulador de fondo plano, una superficie del depósito que comprende polipropileno, de modo que los monocitos estén en contacto con la superficie. Cuando los monocitos utilizados en estos métodos de cultivos son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células de línea celular monocítica, los monocitos se encuentran en los sistemas de ensayo en una alta densidad celular.

La presente invención también se dirige a un método para detectar pirógenos sin endotoxina en un producto médico administrado en forma parenteral, combinando sangre completa, como el reactivo que contiene monocitos y el producto médico que será probado en un sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que comprende polipropileno y al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6, de modo que la sangre está en contacto con la superficie que contiene polipropileno, y ensayar el sistema de ensayo para la presencia de IL-6 enlazada al anticuerpo en la superficie.

La presente invención proporciona además un equipo de diagnóstico que contiene una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de depósitos de microtitulación formados de tal manera que el medio de cultivo contenido en cada depósito esté concentrado en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, una superficie de cada depósito comprendiendo polipropileno, y monocitos críoconservados, es decir, en la forma de un reactivo que

contiene monocito criopreservado, contenido en los depósitos en una placa de microtitulación, de modo que los monocitos estén en contacto con las superficies de los depósitos. Cuando los monocitos en el equipo son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células de línea celular monoclónica, los monocitos se encuentran en los depósitos a una alta densidad.

La presente invención también proporciona un equipo de diagnóstico que contiene un sistema de ensayo para detectar pirógenos sin endotoxina en un producto médico administrado en forma parenteral, comprendiendo un sistema de ensayo una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de depósitos de microtitulación formados de modo que el medio de cultivo contenido en cada depósito sea concentrado en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, una superficie de cada depósito comprendiendo polipropileno, sangre completa criopreservada, en la forma del reactivo que contiene monocito criopreservado, contenido en los depósitos de la placa de microtitulación, de modo que la sangre esté en contacto con las superficies de los depósitos, y un anticuerpo para IL-6.

Otros objetos y características de la presente invención, podrán ser apreciados y señalados más adelante.

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 para muestras de prueba que tienen cuatro diferentes densidades celulares (1 millón, 0.5 millones, 0.25 millones y 0.13 millones PBMC por 250 µl depósito) en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica o placas de polipropileno con depósitos de fondo redondo, con IL-6 como la lectura. Las respuestas IL-6 are son

para el estándar de endotoxina (1 unidad de endotoxina por ml) y control positivo Extraneal® (es decir, un lote de este producto contaminado con pirógeno sin endotoxina).

La figura 2, es una gráfica que ilustra las respuestas IL-6 para muestras de prueba que tiene una baja densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con sangre completa en placas de poliestireno con depósitos de fondo plano. Las respuestas IL-6 serán LPS, control negativo Extraneal® (es decir, un lote limpio de este producto), control positivo Extraneal®, control negativo de Hemoglobina (Hb) (es decir, un lote limpio de este producto), y control positivo de Hemoglobina (Hb) (es decir, un lote de este producto contaminado con pirógeno sin endotoxina).

La figura 3, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 para muestras de prueba que tiene una baja densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de poliestireno en depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS, controles positivos y negativos Extraneal® y controles positivos y negativos Hb.

La figura 4, es una gráfica que ilustra las respuestas IL-6 de muestras de prueba que tiene baja densidad celular en una prueba de activación de monocito llevada a cabo con células MONOMAC6 en placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS, controles positivos y negativos Extraneal® y controles positivos y negativos Hb.

La figura 5, es una gráfica que ilustra las respuestas IL-6 para muestras de prueba que tiene una baja densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células THP-1 en placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS, controles positivos

y negativos Extraneal® y controles positivos y negativos Hb.

La figura 6, es una gráfica que ilustra respuestas TNF- α de muestras de prueba que tiene una baja densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con
5 células THP-12A9 sobre placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas TNF- α son para LPS, controles positivos y negativos Extraneal® y controles positivos y negativos Hb.

La figura 7, es una gráfica que ilustra las respuestas IL-6
10 para muestras de prueba que tiene baja densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células de clon MONOMAC6-CA8 sobre placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 serán para LPS, y controles positivos y negativos Extraneal®.

15 La figura 8, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 para muestras de prueba que tiene baja densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células 28SC en placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS y controles positivos y
20 negativos de dextrano.

La figura 9, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 de muestras de prueba que tienen alta densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de
25 polipropileno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 serán para LPS, controles positivos y negativos Extraneal® y controles positivos y negativos de dextrano.

La figura 10, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 de muestras de prueba que tiene una baja densidad celular en una
30 prueba de activación de monocitos llevada a cabo con sangre completa en placas de polipropileno con depósitos de fondo

redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS, y controles positivos y negativos Extraneal®.

La figura 11A, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 de placas de polipropileno (columnas negras) y placas de poliestireno (columnas color gris) en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica (1 millón de células por depósito). Las respuestas IL-6 son para LPS, controles positivos y negativos Extraneal® y controles positivos y negativos Hb.

La figura 11B, es una gráfica que ilustra respuestas IL-1 β de placas de polipropileno (columnas negras) y placas de poliestireno (columnas color gris) en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica (1 millón de células por depósito). Las respuestas IL-1 β son para LPS, controles positivos y negativos Extraneal® y controles positivos y negativos Hb.

La figura 12A, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 de muestras de prueba que tienen alta densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de polipropileno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS y controles positivos y negativos Extraneal®.

La figura 12B, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 de muestras de prueba que tienen baja densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS y controles positivos y negativos Extraneal®.

La figura 13A, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 para las muestras de prueba que tienen alta densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con

células mononucleares de sangre periférica sobre placas de polipropileno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS y controles positivos y negativos Extraneal®.

La figura 13B, es una gráfica que ilustra las respuestas IL-6 de muestras de prueba que tienen alta densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS y controles positivos y negativos Extraneal®.

La figura 14A, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 para muestras de prueba que tienen alta densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica en placas de polipropileno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS y controles positivos y negativos Extraneal®.

La figura 14B, es una gráfica que ilustra respuestas IL-6 de muestras de prueba que tienen alta densidad celular en una prueba de activación de monocitos llevada a cabo con células mononucleares de sangre periférica en placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son para LPS y controles positivos y negativos Extraneal®.

La figura 15, es una gráfica que ilustra respuesta IL-1 β de muestras de prueba que tienen alta densidad celular en una prueba IPT comercialmente disponible llevada a cabo con sangre completa en placas de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Las respuestas IL-1 β son para LPS, controles positivos y negativos Extraneal®, controles positivos y negativos de hemoglobina, control salino y control Gram positivo.

Descripción Detallada de la Invención

Los pirógenos estimulan monocitos de sangre (así como otros leucocitos) y macrófagos que producen y liberan

numerosos transmisores pirogénicos endógenos de la respuesta inflamatoria, incluyendo citocinas (por ejemplo, TNF- σ , IL-1/3, y IL-6).. la liberación de estos transmisores pirogénicos en la circulación ha sido una cascada de eventos que conducen a una respuesta inflamatoria en el individuo afectado. La prueba de activación de monocitos de la presente invención, depende de la medida de estos pirógenos endógenos como un marcador de una respuesta inflamatoria. De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, se incuba una muestra con un reactivo que contiene monocitos en un primer sistema de ensayo que comprende una superficie comprendida de polipropileno, el reactivo que contiene monocitos estando presente en el sistema de ensayo en una alta densidad. Los contenidos del primer sistema de ensayo posteriormente son transferidos a un segundo sistema de ensayo que comprende una superficie recubierta con anticuerpos anti-citocina, y el segundo sistema de ensayo es ensayado para la presencia de citocinas enlazadas a la superficie a través de los anticuerpos.

Las pruebas de pirógenos de la presente invención se utilizan para detectar pirógenos sin endotoxina es decir bacteria Gram-positiva (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) o sus componentes (por ejemplo, muropéptido, ácido lipoteicoico, enterotoxinas, estreptolisina), estimuladores inmune tales como fitohemaglutimina o forbolesteras, así como endotoxina. Debido a que la prueba utiliza la respuesta de citocina de monocitos para diversos pirógenos en lugar de una respuesta específica a endotoxina de bacteria Gram negativa, se puede detectar un amplio espectro de agentes pirogénicos con la prueba de la presente invención.

Las pruebas de pirógeno de la presente invención han mostrado ser más efectivas para detectar pirógenos sin

endotoxina en lotes contaminados de un producto médico con comparación con pruebas convencionales. Los ejemplos de la presente invención muestran que estas pruebas convencionales no tiene la capacidad de distinguir muestras de control positivo de una solución de diálisis peritoneal Extraneal®, hemoglobina, o dextrano de muestras de control negativo de los mismos parenterales. La muestra de control positivo Extraneal® se obtuvo de un lote de producto contaminado con pirógenos sin endotoxina; el otro contaminado originó reacciones adversas en humanos, aunque probó ser negativo para la presencia de pirógeno de acuerdo con una prueba LAL, la cual únicamente prueba los pirógenos de endotoxina (Martis, y asociados, Lancet, 365(9459), 588). La muestra de control positivo de hemoglobina obtenida de un lote de producto contaminado con pirógeno sin endotoxina; el otro contaminado originó respuestas de fiebre en conejos, aunque probó ser negativo para la presencia de pirógeno de acuerdo con una prueba LAL. El control positivo de dextrano fue una preparación de dextrano que se ha descubierto que origina fiebre en humanos aunque probó ser negativo para la presencia de pirógeno de acuerdo con una prueba LAL. La capacidad de la prueba de detectar contaminantes sin endotoxina en productos médicos es de gran valor ya que permite la identificación de lotes de producto médico contaminado antes de que el lote sea liberado para utilizarse en pacientes. Las pruebas conocidas funcionan bien dentro del contexto de detectar pirógenos sin endotoxina y con endotoxina puro, es decir peptidoglican (PG) de *S. aureus* y LPS de *E. coli* tal como se describe en la Publicación de Nakagawa y asociados, tal como se describió anteriormente, o el ajuste de endotoxina de productos, es decir, se ajustaron varios fármacos con diferentes concentraciones de endotoxina

///

en las seis pruebas del Estudio Humano(e) tal como se describió anteriormente. La función de las pruebas LAL proporcionó de manera efectiva un producto médico contaminado con endotoxina (Mascoli, CC, Weary, M. E., J Parenter Drug Assoc. 2003, 33, 81; Mascoli, CC, Weary, M.E., Prog Clin Biol Res. 2003, 29, 387). Sin embargo, cuando un producto médico está contaminado con pirógenos sin endotoxina, dichas pruebas fallan en detectar el pirógeno. Sin limitarse a una teoría en particular, se considera que el pirógeno sin endotoxina intercepta con el producto médico dando como resultado un "ocultamiento" del pirógeno y la incapacidad de detectar contaminantes sin endotoxina.

Las pruebas de pirógeno de la presente invención, superan este efecto de ocultamiento y tienen la capacidad de detectar contaminantes sin endotoxina en productos médicos: por ejemplo, en una modalidad preferida, en la cual PBMCs se cultivaron a una alta densidad celular en depósitos de polipropileno de fondo redondo, la prueba de pirógeno de la presente invención tuvo la capacidad de distinguir entre muestras de control positivo y negativo de solución Extraneal® y dextrano (ver figura 9). Ninguno de los equipos disponibles que fueron probados tuvieron la capacidad de distinguir entre controles positivos y negativos Extraneal® o de hemoglobina (ver figuras 1 a 8). Nuevamente, sin pretender atarse a la teoría, se considera que las altas densidades celulares proporcionan más células para un mayor contacto célula con célula. El contacto incrementado célula con célula, facilita mayor comunicación entre células, y por consiguiente, da como resultado una respuesta inflamatoria mejorada a un contaminante pirogénico. Las células se comunican entre sí a través de transmisores solubles, tal como citocinas, y a través

del contacto célula con célula, en donde las citocinas también pueden tomar parte. Un depósito de fondo redondo, o un depósito con forma general de modo que las células estén concentradas, proporciona un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de fondo redondo. Y se considera que el polipropileno incrementa la biodisponibilidad de pirógenos sin endotoxina. Nuevamente, sin estar atados a una teoría en particular, se considera que el tratamiento de la superficie de las placas de poliestireno tal como se utiliza convencionalmente en cultivo celular, hace a su superficie menos hidrofóbica y con mejor capacidad de enlazar a células, pero también origina que su superficie enlace y neutralice los pirógenos sin endotoxina. La placa de polipropileno no está tratada en la superficie, de modo que permanece más hidrofóbica que la placa de poliestireno y probablemente neutraliza en menor cantidad los pirógenos sin endotoxina.

1. Componentes de Prueba de Pirógenos

Una prueba de pirógeno que está caracterizada por cierta combinación de los tres elementos antes descritos, alta densidad celular, fondo redondo (o una forma adecuada diferente), y polipropileno, es decir, PBMCs presentes en una alta densidad celular en un depósito de poliestireno en fondo redondo, permite una detección mejorada de contaminación sin endotoxina en productos médicos. Las pruebas de pirógenos de la presente invención pueden utilizarse para probar una variedad de productos médicos para la presencia de contaminación sin endotoxina, incluyendo productos de sangre, productos médicos para administración parenteral, dializados, vacunas, soluciones intravenosas y cualquier fluido que contacte el cuerpo o fluidos corporales.

A. Transmisores Citocina o Endógeno de la Respuesta

Inflamatoria

Cualquier transmisión endógena de la respuesta inflamatoria secretado por el reactivo que contiene monocitos que es detectable, puede ser utilizado como la base de la prueba de pirógeno de la presente invención. Sin embargo, preferentemente, se emplea un marcador de citocina o endotelina debido a que es más fácil ser detectado a través de un método de la presente invención. Se ha descubierto que los monocitos en sangre completa incubados con pirógeno con endotoxina o sin endotoxina produce varias clases de citocinas, incluyendo pero sin limitarse a citocinas pre-inflamatorias. (TNF- α , IL-1, IL-6), citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, IL-1ra, TGF), Th1 (IL-2, IFN, IL-12), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), IL-1 β , IL-1ra, IL-8 y PGE₂. Los marcadores de citocina preferidos para utilizarse en la presente invención incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8 y PGE₂. IL-6 es un marcador de citocina particularmente preferido para ensayarse en la presente invención. IL-6 se produce en cantidades detectables dentro de un periodo de incubación relativamente corto. IL-6 inmunorreactivo, a diferencia de IL-1 β inmunorreactivo y TNF- α , se secreta completamente en el medio/sangre acondicionado con la célula, en grandes cantidades, lo que permite su estimado total. En contraste, TNF- α y IL-1 β inmunorreactivos permanecen en gran parte intracelulares, elevando la posibilidad de que las preparaciones de prueba que afectan la permeabilidad celular puedan interferir más fácilmente en la prueba con (inmunorreactivo) TNF- α o IL-1 β en la forma de la lectura, en lugar de IL-6 (ver figuras 2 y 3). Sin embargo, TNF- α o IL-1 β también pueden utilizarse como un marcador de citocina en la presente invención. TNF- α se produce en forma más temprana que IL-6 en la respuesta de

pirógeno de monocito. Por lo tanto, una modalidad de la presente invención que ensaya TNF- α puede utilizar un tiempo de incubación más corto (~ 1 a 2 horas) que modalidades que ensayan IL-6. Los diferentes contaminantes pirogénicos pueden
5 provocar diferentes respuestas de citocina en el cultivo celular. Por consiguiente, la presente invención puede ser diseñada para detectar la formación de citocinas particulares cuando la contaminación con un pirógeno particular que origina una secreción de dichas citocinas, es probable para un producto
10 farmacéutico.

B. Anticuerpo para el Transmisor de Citocina o Endógeno

Una vez que la citocina que será ensayada ha sido determinada, se debe elaborar un anticuerpo para dicha citocina para utilizarse en la presente invención. Los anticuerpos
15 policlonales purificados bajo condiciones estrictas, tal como se describe en el ejemplo 1 de la patente norteamericana No. 6,696,261, la cual está incorporada en su totalidad a la presente invención como referencia, trabajan bien en la prueba de pirógeno. Debido a que la sangre animal de la cual los
20 anticuerpos policlonales se aíslan es naturalmente libre de pirógenos (si se toma de animales saludables) se debe prevenir simplemente la contaminación de materiales sin procesar con pirógenos durante purificación para obtener un producto libre de pirógeno. Se utilizan amortiguadores libres de pirógeno y fases
25 sólidas en columnas de cromatografía de afinidad para obtener anticuerpos policlonales libres de pirógenos tal como se describe en el ejemplo 1 de la Patente Norteamericana No. 6,696,261. Como alternativa, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales de cultivos de hibridoma. Sin embargo, cuando se
30 utilizan anticuerpos monoclonales, se debe tener cuidado de aislar los anticuerpos de cualquier pirógeno contaminante que

pueda encontrarse en el cultivo de célula de hibridoma.

Para utilizarse en la presente invención, el anticuerpo para las citocinas se aplica a una superficie en un sistema de ensayo. Los métodos, tales como recubrimiento, para anticuerpos de enlace sobre la superficie en un sistema de ensayo, tal como depósito de microtitulación, son bien conocidos en las técnicas bioquímicas. Muchos sistemas de ensayo están comercialmente disponibles y el fabricante normalmente proporciona materiales e instrucciones para recubrir anticuerpos sobre una superficie del sistema. Debido a su facilidad de lectura y el pequeño volumen de muestra requerido, los depósitos de microtitulación en los cuales la parte de la superficie interior del depósito se recubre a través del anticuerpo, se utilizan en una modalidad preferida de la presente invención. Con el objeto de explotar completamente las ventajas de la presente invención, se prefiere que el microtitulador sea parte de una placa de microtitulación, la cual es una formación plana de depósitos similares, situados de modo que la formación de depósitos pueda ser leída con un equipo de lectura de placa de inmunoensayo automático (ver por ejemplo Patente Norteamericana No. 5,281,540, incorporada a la presente invención como referencia). El equipo automático tal como los lectores de placa ELISA (por ejemplo Ultramark Microplate Reader, disponible en Bio-Rad Laboratories, Inc.) automatiza el proceso de evaluación del ensayo y disminuye en gran medida el costo por prueba. Si se desea, las placas de depósitos de microtitulación se pueden hacer libres de pirógenos (si no están suministrados ya como tal) mediante un lavado extenso con amortiguador libre de pirógeno. En una modalidad particularmente preferida de la presente invención, se recubren anticuerpos policlonales anti-IL-6 sobre los

depósitos de una placa ELISA. Sin embargo, otros formatos de prueba de inmunodiagnóstico (por ejemplo, en donde el anticuerpo se recubre sobre una varilla indicadora o gránulo) son aceptables para utilizarse en la presente invención.

5 Además del anticuerpo de "captura", otros anticuerpos y reactivos para utilizarse en el ensayo de las citocinas, pueden aplicarse cuando se elaboran sistemas de placa de microtitulación para utilizarse en la presente invención. Por ejemplo, después de que se aplica el anticuerpo de captura a la
10 placa de microtitulación, los sitios de enlace restantes de la placa pueden ser "bloqueados con otra proteína. Después del bloqueo, el anticuerpo de detección etiquetado (tal como un anticuerpo biotinilado o etiquetado con enzimas) puede aplicarse a la placa de microtitulación, junto con un compuesto
15 de glaseado protector. Por lo tanto, cuando se incuba una muestra en el depósito de microtitulación tal como se describirá más adelante, se captura una citocina liberada a través del anticuerpo de captura enlazado al depósito, y se etiqueta a través del anticuerpo de detección en forma simultánea durante
20 el período de incubación de la muestra.

C. Reactivo que Contiene Monocitos

 Como el primer paso en las pruebas de pirógeno de la presente invención, se cultivan células contenidas en el reactivo que contiene monocitos, combinando el reactivo que
25 contiene monocitos y la muestra que será aprobada en un sistema de ensayo. El reactivo que contiene monocitos de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en PBMCs, células de línea celular monocítica, sangre completa o cualquier línea celular que exprese o pueda ser elaborada para
30 expresar los receptores tipo Toll (TLRs) que están implicados en las respuestas de transmisión a los activos proinflamatorios

117

y pirogénicos, incluyen células en las cuales estos receptores han sido inducidos o clonados. Preferentemente, la línea celular monocítica es seleccionada del grupo que consiste en MONOMAC-6 (MM6), THP-1 y 28SC. Los monocitos en el
5 reactivo que contiene monocitos, son preferentemente monocitos de las mismas especies para las cuales el producto probado será administrado (es decir, humano para productos farmacéuticos; gato, perro, caballo, etc., para productos veterinarios). Sin embargo, los monocitos de otras especies con
10 la reactividad de pirógeno deseada también pueden ser utilizados. En ciertas modalidades preferidas, el reactivo que contiene monocitos comprende PBMCs.

En una modalidad de la presente invención, el reactivo que contiene monocitos es sangre completa y el sistema de
15 ensayo incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, de modo que el reactivo que contiene monocitos está en contacto con la superficie.

En otra modalidad, el reactivo que contiene monocitos es PBMCs presentes en alta densidad celular, y el sistema de
20 ensayo incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, polietileno, poliestireno, u otro material similar en contacto con las PBMCs.

Cuando el reactivo que contiene monocitos es PBMCs o células de la línea celular, el reactivo se encuentra en el
25 sistema de ensayo en una alta densidad celular, para facilitar un mayor contacto célula con célula, tal como se explica con detalle anteriormente. En ciertas modalidades, el reactivo que contiene monocitos se encuentra en un sistema de ensayo a una densidad celular por depósito de al menos
30 aproximadamente 125,000 células, al menos aproximadamente 250,000, 500,000, 600,000, 700,000, 800,000, 900,000,

1,000,000, 1,100,000, 1,200,000, 1,300,000, 1,400,000,
1,500,000, 1,600,000, 1,700,000, 1,800,000, 1,900,000 ó
2,000,000 células por depósito. Uno experto en la técnica podrá
reconocer que la densidad celular máxima se excede cuando
5 existen nutrientes celulares insuficientes en el volumen de
reactivo dentro del depósito para mantener adecuadamente las
células dentro del depósito,

Cuando el reactivo que contiene monocitos es sangre
completa, el reactivo se encuentra en el sistema de ensayo en
10 una densidad celular inferior que PBMCs o células de línea
celular. En ciertas modalidades en donde el reactivo que
contiene monocitos es sangre, el reactivo se encuentra en el
sistema de ensayo en una densidad celular de al menos
aproximadamente 100,000 células mononucleares de sangre
15 periférica por depósito, al menos aproximadamente 200,000,
210,000, 220,000, 230,000, 240,000, 250,000, 260,000,
270,000, 280,000, 290,000, 300,000, 310,000, 320,000,
330,000, 340,000, 350,000, 360,000, 370,000, 380,000, 390,000
ó 400,000 PBMC por depósito. Sin pretender atarse a teoría en
20 particular, se considera que la sangre completa puede utilizar
en una densidad celular menor en comparación con PBMCs o
células de línea celular debido a que los monocitos están en su
ambiente natural, y todos los componentes del suero que
pueden influenciar su respuesta a pirógenos están presente en
25 la solución. Además, cuando el reactivo que contiene monocitos
comprende sangre completa, la lectura de la prueba de pirógeno
es IL-6.

Preferentemente, cuando se utiliza sangre como el
reactivo que contiene monocitos, la sangre es fresca, o con
30 menos de 24 horas de existencia, y más preferentemente menos
de 4 horas de existencia. Asimismo, cuando se utiliza sangre

completa, se puede incluir anticoagulantes para retardar o evitar la coagulación de la sangre; los anticoagulantes adecuados incluyen citrato (por ejemplo, a una concentración final de 0.38%) heparina (heparinato de sodio) o fragmin (heparina de bajo peso molecular). Se pueden utilizar aditivos anticoagulantes sin afectar la respuesta de los monocitos a pirógenos en la muestra de prueba. También se puede eluir la sangre completa con un amortiguador adecuado u otro diluyente, tal como medio de cultivo celular RPMI o solución salina fisiológica. La sangre completa se diluye preferentemente al menos al 50%, más preferentemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 25%, y más preferentemente aproximadamente 20% del volumen total para incubación (ver figura 1 Patente Norteamericana No. 6,696,261). Al diluir la sangre completa, la curva de respuesta IL-6 de la mayoría de los donantes puede llevarse dentro de un rango compacto que puede ser utilizado para cuantificar un mayor rango de concentraciones de contaminación con pirógenos (ver figura 3 de la Patente Norteamericana No. 6,696,261).

20 **2. Sistema de Dos Ensayos**

En ciertas modalidades de la presente invención, la prueba de pirogenicidad se lleva a cabo en un sistema de contenedor de dos ensayos, de modo que los pasos de la incubación de prueba con el reactivo que contienen monocitos y la captura de citocina(s) producida por el reactivo que contiene monocitos, ocurre en sistemas de dos contenedores de ensayo diferentes. El paso de incubación después del paso de cultivo descrito anteriormente; la incubación de la muestra de prueba con el reactivo que contiene monocitos (tal como PBMCs) se lleva a cabo en el mismo sistema de ensayo que el paso de cultivo. El tiempo de incubación óptimo para utilizarse en la

prueba de pirógenos de la presente invención, variará dependiendo de las condiciones de ensayo, es decir la citocina que es ensayada. Por ejemplo, cuando se incuba sangre completa con endotoxina y la lectura es IL-6, se produce una
5 citocina adicional mínima a través del reactivo que contiene monocitos después de la incubación durante 6 horas; después de 4 horas de incubación, se ha secretado una cantidad suficiente de IL-6 por parte del reactivo para permitir la cuantificación del contaminante de pirógeno. Cuando la sangre
10 completa se incuba con pirógeno sin endotoxina y se utiliza cualquier lectura, una cantidad suficiente de IL-6 ha sido secretada por el reactivo para permitir la cuantificación del contaminante de pirógeno después de aproximadamente 16 a 24 horas de incubación. Para una modalidad de la presente
15 invención que ensaya la producción IL-6, se prefiere un tiempo de incubación de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 24 horas, preferentemente de aproximadamente 12 hasta aproximadamente 24 horas, y más preferentemente de aproximadamente 16 hasta aproximadamente 24. Si se ensaya
20 otra citocina, el periodo de incubación debe ser optimizado para la producción de dicha citocina particular. Dicha optimización está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Si la citocina que será ensayada no es liberada a través de los monocitos, las células pueden ser lisadas mediante
25 descongelación o agregando un detergente al final del periodo de incubación en una concentración que no interrumpa el enlace de los ligandos a los anticuerpos.

Una vez que se contempla el paso de incubación, los contenidos del sistema de ensayo (el primer sistema de
30 ensayo), es decir el reactivo que contiene monocitos y la muestra de prueba, se transfieren a un segundo sistema de

ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria, por ejemplo, endotelina. El segundo sistema de ensayo, se ensaya para la presencia de transmisor de citocinas o endógeno en la superficie recubierta con el anticuerpo transmisor anti-citocina o anti-endógeno. Preferentemente, se mantienen condiciones estériles, rigurosas en todos los puntos en el procedimiento antes de que la superficie recubierta con anticuerpo sea ensayada con respecto a citocina enlazada. Si se utiliza una placa lisa recubierta con un anticuerpo de captura como la modalidad de la presente invención, la placa se lava, y el segundo anticuerpo anti-citocina conjugado con una enzima, se agrega a la placa ELISA (a menos que el segundo anticuerpo etiquetado, "de detección" se agregado inicialmente a la placa antes del glaseado o junto con los contenidos de primer sistema de ensayo). La placa ELISA se lava nuevamente, y la adición de un sustrato a la placa ELISA produce un color. Después de un tiempo de incubación corto, la reacción se termina, y la densidad óptica de la solución se mide en un lector de placa ELISA. Este proceso se refiere en forma adicional en el ejemplo 2 de la Patente Norteamericana No. 6,696,261. Como alternativa, se pueden utilizar técnicas de inmunoensayo no enzimáticas. Por ejemplo, el segundo anticuerpo del "emparedado" de inmunoensayo puede ser etiquetado con una porción fluorescente o un isótopo radioactivo. Después de lavarse, la cantidad de citocina capturada en el depósito puede ser cuantificada detectando la cantidad de fluorescencia o radiación presente en el depósito. Están disponibles comercialmente varios sistemas de ensayo con base enzimática o no enzimática y pueden ser modificados fácilmente para utilizarse en la

presente invención, a través de un experto en la técnica.

3. Sistema de un Ensayo

En ciertas modalidades de la presente invención, se lleva a cabo la prueba de pirogenicidad en un sistema de un
5 contenedor de ensayo, de modo que los pasos de la incubación de muestra con el reactivo que contiene monocitos y la captura de citocina(s) producida por el reactivo que contiene monocitos, ocurre en el mismo sistema de contenedor de ensayo. El sistema de ensayo comprende al menos una superficie que
10 comprende polipropileno y al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria. El paso de incubación sigue el paso de cultivo descrito anteriormente y se lleva a cabo en el mismo sistema de ensayo que el paso de cultivo. Tal como se describió
15 anteriormente dentro del contexto del sistema de dos contenedores de ensayo, el tiempo de incubación óptimo para utilizarse en la prueba de pirógenos de la presente invención, variará dependiendo de las condiciones de ensayo, es decir la citocina que será ensayada. Generalmente, las técnicas con
20 respecto al paso de incubación descritas con respecto al sistema de dos contenedores de ensayo aplica también al sistema de un contenedor de ensayo. El periodo de incubación debe ser optimizado para la producción de una citocina particular, y dicha optimización está dentro de las capacidades
25 de un experto en la técnica. Si la citocina que será ensayada no es liberada por los monocitos, las células pueden ser lisadas mediante descongelación, o agregando un detergente al final del periodo de incubación en una concentración que no interrumpa el enlace de los ligandos a los anticuerpos.

30 Una vez que se completa el paso de incubación, el sistema de ensayo, el cual comprende al menos una superficie tratada

con un anticuerpo para una citocina o transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria, por ejemplo, endotelina, se ensaya para la presencia de transmisor de citocina o endógeno en la superficie recubierta con el anticuerpo transmisor de anti-
5 citocina o anti-endógeno. Preferentemente, se mantiene en condiciones estériles, rigurosas en todos los puntos en el procedimiento antes de la superficie recubierta con anticuerpo sea ensayada para la citocina enlazada. Generalmente, la descripción con respecto al paso de ensayo del sistema de dos
10 contenedores de ensayo, es decir, la descripción de las técnicas de inmunoensayo de placa ELISA y no enzimáticos, aplican también a un sistema de un contenedor de ensayo.

En general, el sistema de un contenedor de ensayo y el sistema de dos contenedores de ensayo son intercambiables.

15 **4. Contenedores de Ensayo**

Los sistemas de ensayo de la presente invención comprenden al menos una superficie en contacto con el reactivo que contiene monocitos. En ciertas modalidades de la presente invención, el sistema de ensayo(s) incluye al menos un depósito
20 de microtitulación, y la superficie es al menos una parte del interior del depósito de microtitulación. En modalidades particulares, la superficie del depósito de microtitulación comprende un recubrimiento de polipropileno o un depósito de microtitulación completo está compuesto de polipropileno. En
25 ciertas modalidades, en donde el sistema de ensayo comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o para un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria, la superficie en la cual se aplica el anticuerpo, es al menos una parte del interior del depósito de microtitulación.
30 Preferentemente, el depósito de microtitulación se forma de modo que el reactivo que contiene monocito esté concentrado

en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano.

En ciertas modalidades, el depósito(s) de microtitulación comprende una parte superior abierta, una región superior que
5 se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta, y una pared del fondo que se ahusa en diámetro desde una ubicación arriba del punto más bajo hacia el punto más bajo.

En ciertas modalidades, el depósito(s) de microtitulación comprende una región superior abierta, una región superior que
10 se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta que tiene un extremo superior y un extremo del fondo, y una región inferior que tiene un extremo superior y un punto más bajo, extendiéndose la región del fondo desde el extremo del fondo de la región superior y ahusándose en diámetro más
15 rápidamente que la región superior desde el extremo superior de la región del fondo hacia el punto más bajo.

En ciertas modalidades, la pared del fondo del depósito de microtitulación es no plana, preferentemente curva, algunas veces parabólica. En ciertas modalidades particulares, la pared
20 del fondo se extiende hacia abajo, o los lados del depósito de microtitulación se hacen en pendiente hacia abajo.

5. Equipo de Diagnóstico

Cualesquiera de las modalidades descritas anteriormente pueden ser incorporadas en un equipo de diagnóstico para
25 llevar a cabo pruebas pirogénicas. El equipo se utiliza para detectar una variedad de pirógeno sin endotoxina, incluyendo bacteria Gram positiva (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) o sus componentes (por ejemplo, muropéptido, ácido lipoteicoico, enterotoxinas, estreptolisina), así como pirógenos de
30 endotoxina en una variedad de productos médicos, incluyendo productos de sangre u otros parenterales, tales como

dializados, vacunas y soluciones intravenosas. Generalmente, dicho equipo incluye una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de depósitos de microtitulación formados de modo que el medio de cultivo contenido en cada
5 depósito sea concentrado en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, comprendiendo los depósitos al menos una superficie que comprende polipropileno. Los depósitos de la placa de microtitulación contienen un reactivo que contiene monocitos crioconservados que comprenden
10 sangre completa crioconservada, células mononucleares de sangre periférica crioconservados o líneas celulares de célula monocítica crioconservada, las cuales están en contacto con las superficies de los depósitos. En ciertas modalidades, los depósitos de la placa de microtitulación comprenden
15 polipropileno. Cuando el reactivo que contiene monocito crioconservado comprende células mononucleares de sangre periférica crioconservadas o células de línea celular monocítica crioconservada, el reactivo se encuentra en los depósitos en una alta densidad. Los equipos que contienen sangre completa
20 crioconservada como el reactivo que contiene monocitos también contienen anticuerpos para IL-6, ya que IL-6 es la lectura preferida.

En modalidades particulares, los depósitos incluyen una barrera que es impermeable a los monocitos. La barrera
25 comprende al menos una superficie comprendida de un material libre de pirógenos, y normalmente es una membrana, una rejilla, un cernidor o un cribador. La barrera es preferentemente estéril. Los materiales de barrera adecuados para utilizarse en placas de microtitulación son conocidos en la técnica. La
30 barrera, la cual es permeable a fluidos, permite que las células crioconservadas sean lavadas sin eliminarlas de los depósitos;

se puede eliminar el sulfóxido de dimetilo (DMSO), lo cual baña las células criopreservadas y actúa como un conservador, de modo que no interfiera con la prueba. Las muestras de prueba se agregan arriba de la barrera, penetra en la barrera, contactan células debajo de la barrera, y estimulan potencialmente estas células para producir citocinas. Las citocinas liberadas mediante células, se difunden en el medio arriba de la barrera. Normalmente, las soluciones arriba y debajo de la barrera se mezclan profundamente, aspirando las soluciones. En forma subsecuente, una alícuota de medio bien mezclado de la parte superior de la barrera, se ensaya con respecto a la presencia de citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria.

6. Interpretación de Datos de Producción de Citocina

A. Método de Curva Estándar

Con el objeto de interpretar en forma adecuada los datos de producción de citocina generados en la prueba de pirógeno de la presente invención, se genera una curva estándar de endotoxina incubando el reactivo que contiene monocitos con endotoxina estándar USP. El propósito de esto es cuantificar la respuesta de producción de citocina medida para una muestra de prueba en términos de respuesta observada para un pirógeno conocido. Se puede generar una curva estándar de cualquier número de puntos de datos estadísticamente significativos generados con concentraciones significativamente variadas de endotoxina estándar utilizando un software de análisis de datos de mejor ajuste estándar. Los métodos para generar dichas curvas estándar generalmente son conocidos en la técnica. Los solicitantes han descubierto que los puntos de datos de 10, 4, 1, 0.25, 0.06, 0.06 y 0 EU/ml de endotoxina, son adecuados para generar una curva estándar, aunque puede ser

adecuado cualquier número de concentraciones estadísticamente significativo a través de un rango similar. Una vez que se genera una curva estándar, la concentración sin endotoxina equivalente (cuantificada en unidad-equivalentes de endotoxina), se pueden interpolar de la respuesta de citocina utilizando la curva estándar. Ya que la respuesta de los reactivos que contienen monocitos a base de sangre completa pueden variar significativamente de donante a donante, es importante generar una curva estándar para cada grupo de ensayos llevados a cabo con un lote particular de reactivos que contienen monocitos. Sin embargo, debido a que la modalidad de placa ELISA preferida de la presente invención utiliza cantidades muy pequeñas de sangre humana (aproximadamente 40 μ L/depósito) se puede utilizar una unidad simple de sangre donada para varios cientos de depósitos. La curva estándar generada utilizando la endotoxina USP, ayuda a la normalización de los datos en términos de relacionar las unidades de endotoxina (EU, tal como se define a través de USP/FDA, las cuales son idénticas a IU, unidades internacionales tal como se define mediante WHO), la cual es el estándar en la industria para expresar la contaminación de endotoxina/pirógeno.

B. Método de Lote de Referencia

Como alternativa, los datos de producción de citocinas generados en la prueba de pirógenos de la presente invención, pueden interpretarse comparando respuestas de citocinas provocadas por lotes de prueba de un producto para los provocados mediante lotes de referencia de un producto, un lote de referencia contaminado y un lote de referencia no contaminado. Primero, los dos lotes de referencia de un producto químico son identificados: los lotes de referencia son

pirógenos probados y las respuestas de citocinas provocadas por estos lotes, son medidas. Posteriormente, los lotes de prueba son pirógeno probado y las respuestas provocadas por estos lotes se comparan con las de los lotes de referencia.

- 5 Generalmente, una prueba se considerará no contaminada si provoca una menor respuesta al lote de referencia contaminado y una respuesta similar a la del lote de referencia no contaminado. Cada lote de prueba puede ser probado una vez o varias veces. Por ejemplo, de acuerdo con un método de lote de
- 10 referencia, el producto se consideró no contaminado si provocó la liberación de no más de dos veces tanto de IL-6 como el lote de referencia no contaminado en cuatro de los cuatro donantes o siete de los ocho donantes; la prueba se llevó a cabo por duplicado utilizando la sangre de cuatro diferentes donantes.
- 15 Un método de lote de referencia preferido se describe en la publicación de Gaines-Das y asociados, 2004, en donde se requiere que el método de prueba estimule la liberación de menos IL-6 que la referencia. En dicho artículo, se requiere que la preparación de prueba pase la prueba dentro del PBMNC
- 20 procedente de cuatro diferentes donantes. Si la preparación de prueba pasa la prueba con PBMNC de tres de los cuatro donantes, la prueba continúa con PBMNC de cuatro donantes adicionales, ninguno de ellos proporcionó PBMNC para la primera prueba, y se requiere que la preparación de prueba
- 25 pase la prueba con el PBMNC de siete de los ocho diferentes donantes.

En forma conveniente, las pruebas de activación de monocitos de la presente invención tienen una mejor capacidad de detectar la presencia de una amplia variedad de pirógenos,

30 incluyendo pirógenos sin endotoxina, en productos médicos tales productos de sangre, soluciones intravenosas y vacunas.

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente invención, el término pirógeno de endotoxina o sin endotoxina "puro" o pirógeno en su "forma pura" se refiere a una endotoxina que ha sido
5 desprendida de su proteína asociada. La endotoxina pura también es conocida como lipopolisacárido (LPS).

El término "reactivo que contiene monocitos", significa cualquier solución de células de leucocito monocíticas del sistema inmune. Preferentemente, estas células se derivan del
10 organismo al cual el producto que está siendo probado será administrado (por ejemplo, humano para productos farmacéuticos, gato, perro, caballo, etc. para productos vertebrados). Un ejemplo de reactivo que contiene monocitos es la sangre completa humana.

15 El término "sistema de ensayo" significa cualquier contenedor y superficie que puede ser utilizada en una prueba de activación de monocitos, incluyendo un contenedor en el cual las células son cultivadas e incubadas con una muestra de prueba así como un contenedor y superficie con anticuerpo
20 enlazado que puede ser utilizado en un inmunoensayo. Preferentemente, con respecto a llevar a cabo un inmunoensayo, dichos contenedores son placas de depósitos de microtitulación con anticuerpo enlazado a la superficie en el depósito, en donde se puede llevar a cabo un gran número de
25 inmunoensayos enlazados por enzimas colorimétricos en paralelo y los cuales pueden ser evaluados automáticamente a través de una máquina de lectura de placa ELISA. Sin embargo, se consideran otros sistemas de inmunoensayo, especialmente aquellos en donde la superficie recubierta no es
30 necesariamente parte de la pared del contenedor. Por ejemplo, un tubo de prueba más grande que contiene una cuenta de

poliestireno o una varilla indicadora recubierta por el anticuerpo, se puede utilizar en la presente invención.

El término "línea celular monocítica" incluye cualquier línea celular que tenga receptores tipo CD14 y/o Toll endógenos (TLRs) o que haya sido transfectada con CD14 y/o TLRs y/o genes reporteros para transmisores inflamatorios/pirogénicos. La línea celular no tiene que ser monocítica siempre que haya sido transfectada con los componentes de los "receptores pirogénicos" presentes en los monocitos: estos componentes incluyen TLRs y CD14. Por ejemplo, las células de Riñón Embriónico Humano (HEK) ya han tenido la mayor parte de los TLRs y pueden ser transfectadas en forma estable con los TLRs que no tienen – TLR2 y TLR4 - y también CD14 para hacerlos en forma suficiente tipo un monocito para funcionar en los métodos de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de PBMC. Se aislaron PBMCs de sangre periférica heparinizada humana que no tenía más de cuatro horas de existencia, mediante centrifugación de densidad-gradiente utilizando Ficoll Paque (Pharmacia #17-1440-02). Las células se lavaron dos veces con solución salina amortiguada por fosfato de Dulbecco's sin calcio y magnesio (Gibco #14190), se resuspendieron en un medio Minimum Essential Media (MEM) (Gibco #11090), amortiguador HEPES (Gibco #15630) y 5µL del plasma desactivado por calor del propio donante (es decir 2% de la concentración final). Las PBMCs se dividieron a las densidades celulares requeridas (8 millón, 4 millón, 2 millón y 1 millón PBMCs por mL).

Cultivo celular. Se llevaron a cabo cultivos celulares por cuadruplicado en las siguientes placas de microtitulación:

Corning Costar #3790, #3359. 125 μ L de la suspensión celular que contiene 1 millón, 0.5 millón, 0.25 millón o 0.13 millón de células se agregó a cada depósito, seguido de 125 μ L de la muestra de prueba o endotoxina estándar (0.0064-20 EU/mL).

5 La mezcla 250 μ L se mezcló suavemente y se incubó a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en 5% CO_2 y en un aire humidificado. La duración del cultivo fue de 16 a 24 horas, tiempo después del cual se obtuvieron las alícuotas del fluido de cultivo, se diluyeron en 1 en 2 y 1 en 50, y se ensayaron para IL-6.

10 ELISA para IL-6. Las placas de 96 depósitos (Immulon 4, Dynex #011-010-3855) fueron recubiertas con 150 μ L de 3 $\mu\text{g/mL}$ de IgG monoclonal de ratón (R&D Systems #MAB206 disuelto en amortiguador de bicarbonato, pH 9.5) mediante incubación en la noche a una temperatura de $2-8^\circ\text{C}$. Las placas
15 se lavaron tres veces con 300 μ L de amortiguador de lavado (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4). Se bloquearon sitios de enlace no específicos sobre las placas agregando 200 μ L de solución de bloqueo (0.02 g/L Bovine Serum Albumin, Fracción V, libre de proteasa). Las placas nuevamente se lavaron tres
20 veces con 300 μ L del mismo amortiguador de lavado, y 100 μ L de muestras (divididas previamente 1 en 2 y 1 en 50 en el diluyente de muestra) o estándares (7.8-1000 pg/mL del estándar internacional WHO para IL-6, #89/548) fueron agregadas a cada depósito. 100 μ L del diluyente de muestra se
25 agregó a cada depósito no utilizado. La placa se cubrió con un sellador (Falcon #3073) y se incubó con agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 1 hora $\pm$ 5 minutos.

Posteriormente la placa fue aspirada y lavada cinco veces con 300 μ L de amortiguador de lavado. Posteriormente, se
30 agregaron 100 μ L de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo IL-6 anti-humano de cabra biotinilado (R&D Systems, #BAF206) a cada depósito y

la placa nuevamente se cubrió con sellador y se incubó con agitación (de aproximadamente 300 rpm) durante aproximadamente 1 hora $\pm$ 5 minutos.

Posteriormente la placa fue aspirada y lavada cinco veces con 300 μ L de amortiguador de lavado. Posteriormente se agregaron 100 μ L de 0.02 μ g/mL de fosfatasa alcalina (Rockland #S000-05) a cada depósito y la placa se cubrió nuevamente con un sellador y se incubó con agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 1 hora $\pm$ 5 minutos.

La placa se aspiró y se lavó cinco veces con 300 μ L de amortiguador de lavado. Posteriormente, se agregaron a cada depósito 200 μ L de 1 mg/mL pNNP en amortiguador de dietanolamina con 0.5 mM $MgCl_2$. La placa se cubrió nuevamente con sellador y se incubó con agitación (aproximadamente 300 rpm) a temperatura ambiente hasta que la concentración más alta de la curva estándar IL-6 (1000 pg/mL) tuvo una densidad óptica entre aproximadamente 2.5 y 3.0 a 405 nm, punto en el cual la reacción se detuvo agregando 50 μ L de 2M NaOH a cada depósito. La densidad óptica de cada depósito fue determinada a los 30 minutos de que se detuvo la reacción utilizando un lector de microplaca ajustado a 405 nm.

La figura 1, muestra el efecto de la densidad celular en las respuestas IL-6 para el estándar de endotoxina (1 EU/ml) y control positivo Extraneal®. El control positivo Extraneal® fue contaminado con pirógeno sin endotoxina y originó una reacción de fármaco adversa en receptores humanos de este lote de este fármaco, pero proporcionó una respuesta negativa en la prueba LAL (Martis y asociados 2005). Los valores son error promedio $\pm$ estándar de los promedios de cuatro depósitos replicados. Las densidades celulares de 0.25 a 1 millón PBMC por depósito, respondieron en forma similar al estándar de endotoxina 1

EU/ml. La muestra control positiva se detectó de mejor manera utilizando 1 millón > 0.5 millón > 0.25 millón >> 0.13 millón de células por depósito.

Ejemplo 2 – Pruebas de Pirógeno Comparativas

5 Los métodos descritos en la presente invención como el estado corriente de la técnica fueron replicados. Ninguno de estos métodos diferencian controles de producto positivos de solución de diálisis Extraneal®, hemoglobina y/o dextrán de los controles de producto negativo.

10 Los ensayos de Hoffman y asociados, 2005 fueron replicados tal como se describe en la presente invención utilizando placas de microtitulación de poliestireno con depósitos de fondo redondo y lectura IL-6. El reactivo que contiene monocito se utilizó en una baja densidad celular y fue
15 sangre completa (75,000 células por depósito), PBMCs (100,000 células por depósito), MONOMAC6 (250,000 células por depósito), o THP-1 (250,000 células por depósito) en las figuras 2 a 5, respectivamente. Se debe observar que en la figura 5, la lectura IL-6 fue sustituida por neopterina debido a que IL-6 es
20 un pirógeno endógeno (en contraste con neopterina) y una lectura más robusta en los métodos de la presente invención. En la figura 6, las células THP-12A9 en baja densidad celular (250,000 células por depósito) fueron utilizadas como el reactivo que contiene monocitos y TNF fue la lectura.

25 Se replicó el ensayo de Nakagawa y asociados tal como se describe en dicho documento utilizando 1,000,000 células de clon MONOMAC-CA8 por ml como el reactivo que contiene monocitos, lectura IL-6, y placas de microtitulación de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Ver figura 7.

30 El ensayo de Yamamoto y asociados fue replicado tal como se describe en el documento utilizando 1,000,000 células

28C por ml como el reactivo que contiene monocitos, lectura IL-6, y placas de microtitulación de poliestireno con depósitos de fondo redondo. Ver figura 8. Sin embargo, las células 28C fueron primadas con calcitrol (100 ng/ml) en lugar de interferón gamma debido a que este último falló en producir una curva de respuesta-dosis a endotoxina estándar.

Ejemplo 3 – Prueba de Pirógenos de la Presente Invención

Los cultivos (200 µl) de 20% de sangre completa humana (40 µl = aproximadamente 60,000 PBMC/depósito = aproximadamente 300,000 PBMC/ml) fueron llevados a cabo por cuadruplicado en placas de polipropileno de fondo redondo de 96 depósitos (Costar#3790, Corning Incorporated, USA). Las adiciones por depósito fueron: MEM-HEPES (60 µl), sangre de un donante simple (40 µl), endotoxina estándar o muestras Extraneal® diluidas 1:1 con MEM-HEPES (100 µl, es decir la solución Extraneal® estuvo en una dilución final de 1 en 4 ml en el depósito). Los contenidos de los depósitos fueron mezclados arremolinándolos suavemente (sin depósitos de contaminación cruzada) e incubados sin vibración (para permitir que la células se asentaran) a una temperatura de 37°C durante 16 a 24 horas en una atmósfera de 5% CO₂ en el aire. Al final de la incubación de cultivo de tejido, se tomaron 100 µl de alícuotas de sobrenadante claro de cada depósito para el ensayo de IL-6 mediante ELISA.

La metodología utilizada para las muestras de dextrano fue similar a la que se describió anteriormente en el ejemplo 1. El aislamiento celular y cultivo fueron similares, excepto que la densidad celular fue de 400,000 células por depósito y la dilución de muestras utilizada en ELISA fue de 1 en 10. El IL-6 ELISA fue diferente al que utilizó placas recubiertas con el anticuerpo monoclonal de clon 16 (para captura de IL-6) y

anticuerpo policlonal de oveja conjugado para peroxidasa de rábano como el anticuerpo de detección. El ELISA se utiliza en la prueba de sangre completa/IL-6 (NIBSC) y la prueba PBMC/IL-6 (Novartis) tal como se describe en la publicación de Hoffmann y asociados documento 2005.

La figura 9 ilustra resultados comparativos de la muestra de control negativo Extraneal® y muestra de control positivo Extraneal®, y para muestra de control negativo de dextrano y muestra de control positivo de dextrano. Se puede apreciar que la prueba de pirógeno de la presente invención puede diferenciar fácilmente entre estos controles positivos y negativos. La prueba se puede llevar a cabo, por cuadruplicado, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente, con sangre de un solo donante. Los valores son error promedio $\pm$ estándar de los promedios de los cuatro depósitos de réplica.

La figura 10 ilustra resultados comparativos de la muestra de control negativo Extraneal® y la muestra de control positivo Extraneal®. Se puede apreciar que la prueba de pirógenos de la presente invención puede diferenciar fácilmente entre estos controles positivos y negativos. La prueba se llevó a cabo, por cuadruplicado, de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente, con sangre procedente de un solo donante. Los valores son error promedio $\pm$ estándar de los promedios de los cuatro depósitos de réplica. Se debe observar que la baja densidad celular fue suficiente para diferenciar controles Extraneal positivos de los negativos cuando la sangre completa fue el reactivo que contiene monocitos y se utilizaron depósitos de polipropileno de fondo redondo.

Ejemplo 4. Prueba de Pirógeno de la Presente Invención:
Resultados Comparativos para Placas de Polipropileno versus Placas de Poliestireno y IL-6 versus IL-1 β para un

Donante Simple

Las muestras de prueba se prepararon de acuerdo con el método del ejemplo 1, excepto que se utilizaron densidades celulares de 1 millón de células por depósito, algunas muestras
5 fueron sometidas a lectura IL-1 β , y algunas muestras fueron colocadas en placas de microtitulación de poliestireno con depósitos de fondo redondo. La figura 11A muestra que las respuesta IL-6 para controles positivos fueron claramente diferenciadas de los controles negativos para pruebas
10 conducidas en placas de polipropileno, aunque no diferencias para las que están en placas de poliestireno. Los valores son errores promedio $\pm$ estándar de los promedios de los cuatro depósitos de réplica. La figura 11B muestra que IL-1 β responde a controles positivos cuando se distinguió claramente de
15 controles negativos para pruebas llevados a cabo en placas de polipropileno, aunque no se distinguieron de las de que están en placas de poliestireno. Sin embargo, la magnitud de la respuesta en la figura 11B fue mucho menor que la de la figura 11A, lo que indica que IL-1 β es una lectura deficiente en
20 comparación con IL-6. Los valores son error promedio $\pm$ estándar de los promedios de los cuatro depósitos de réplica.

Ejemplo 5 – Prueba de Pirógeno de la Presente Invención: Resultados Comparativos para Placas de Polipropileno versus Placas de Poliestireno para Donantes Múltiples

25 Las muestras de prueba se prepararon de acuerdo con el método del ejemplo 1, excepto que se utilizaron densidades celulares de 0.88 y 1 millón por depósito, se utilizaron tres donantes, algunas muestras se colocaron en placas de microtitulación con depósitos de fondo redondo, y el IL-6 ELISA
30 utilizó placas recubiertas con el anticuerpo monoclonal de clon 16 y un anticuerpo policlonal de oveja conjugado para

peroxidasa de rábano como el anticuerpo de detección tal como se describe en la publicación de Hoffmann y asociados documento 2005. Las figuras 12A y 12B ilustran la respuesta a IL-6 de las placas de microtitulación de polipropileno con depósitos de fondo redondo y placas de microtitulación de poliestireno con depósitos de fondo plano para densidad de células PBMC de 0.88 millón de células por depósito para el donante A, respectivamente. Para el donante A, la prueba de pirógeno no diferenció entre controles positivos y negativos cuando se utilizaron placas de poliestireno, aunque distinguió entre estos controles cuando se utilizaron placas de polipropileno. Las figuras 13A y 13B ilustran la respuesta a IL-6 para placas de microtitulación de polipropileno con depósitos de fondo redondo y placas de microtitulación de poliestireno con depósitos de fondo plano para una densidad celular de PBMC de 1 millón de células por depósito para el donante B, respectivamente. Aunque ambas pruebas de pirógeno diferenciaron entre controles positivos y negativos para el donante B, la respuesta IL-6 del control positivo fue aproximadamente 6 veces la del control negativo utilizando las placas de polipropileno, pero únicamente aproximadamente 2 veces el del control negativo utilizando placas de poliestireno. Las figuras 14A y 14B ilustran la respuesta a IL-6 para placas de microtitulación de polipropileno con depósitos de fondo redondo y placas de microtitulación de poliestireno con depósitos de fondo plano para densidad celular de PBMC de 0.88 millón de células por depósito para el donante C, respectivamente. Aunque ambas pruebas de pirógeno diferenciaron entre controles positivos y negativos para el donante B, la respuesta a IL-6 del control positivo fue aproximadamente dos veces tan grande utilizando las placas de

polipropileno versus las placas de poliestireno. Se debe observar que en polipropileno la respuesta al control positivo Extraneal[®] excede a la respuesta de la dosis más grande del estándar LPS, es decir 0.4 EU/ml, en tanto que en poliestireno la respuesta al control positivo Extraneal[®] es menor que la respuesta para la dosis menor del estándar LPS, es decir 0.1 EU/ml.

Ejemplo 6 – Prueba de Pirógeno Comparativa: IPT (Laboratorios Charles River)

La metodología utilizada para llevar a cabo esta prueba se describe en la hoja de instrucción de Endosafe[®] - IPT InVitro Pyrogen Test (comercialmente disponible en Charles River Laboratories (PIIPT10002)) utilizando el procedimiento para estimulación de sangre completa utilizando IL-1 β y placas de microtitulación de poliestireno. La figura 15 ilustra que la prueba IPT falló en diferenciar entre controles positivos y negativos Extraneal[®] y Hemoglobina, aunque el equipo respondió al estándar LPS y a un control positivo de equipo de ácido lipoteicoico de una bacteria Gram-positiva.

Ejemplo 7 – Prueba de Pirógeno de la Presente Invención Utilizando Células Crio-conservadas

La suspensión celular (por ejemplo 1 millón PBMC o células) en plasma y sulfóxido de dimetilo (o en sangre completa y sulfóxido de dimetilo) se agrega a cada depósito de una placa de polipropileno de 96 depósitos con depósitos de 250 μ L de fondo redondo, los cuales posteriormente se sellan y crio-conservan.

El día de la prueba, la placa se descongeló, se llevó a temperatura ambiente, el sello se eliminó y el inserto de 96 depósitos se empujó firmemente en la posición. El inserto tuvo paredes de polipropileno y un fondo plano que es una barrera

para el paso de células, pero no de líquidos.

El DMSO se lavó de las células llenando el inserto con medio fresco y aspirando el medio hacia arriba y hacia abajo para mezclar las soluciones arriba y debajo de la barrera
5 celular antes de aspirar y desechar la solución que se encuentra arriba de la barrera celular. Al repetir este paso de lavado 5 veces, las células son lavadas esencialmente libres de DMSO y se retienen en un volumen conocido de medio fresco.

La muestra de prueba o estándar y el medio más fresco
10 fueron agregados al inserto, y aspirando esta solución hacia arriba y hacia abajo para mezclar las soluciones arriba y debajo de la barrera celular, el pirógeno en la muestra o estándar (pirógeno) se dejó tener acceso a las células.

Esta placa se incubó a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en gas
15 de dióxido de carbono al 5% en aire humidificado durante 16-24 horas. Durante la incubación, el asentamiento celular permitió que las células se contactaran entre sí, lo cual facilita la liberación IL-6 estimulada por pirógeno. Al final del periodo de incubación, las soluciones arriba y abajo de la barrera celular
20 se mezclaron profundamente aspirando la solución arriba de la barrera celular hacia arriba y hacia abajo, antes de que se tomara una alícuota de un medio acondicionado por células para el ensayo de IL-6.

Las PBMCs crioconservadas son convenientes debido a
25 que pueden ser transportadas fácilmente sobre hielo seco en todo el mundo. A diferencia de poliestireno, el polipropileno soporta nitrógeno líquido sin desquebrarse. A la llegada, las PBMCs únicamente necesitan ser descongeladas y lavadas para quedar libres de DMSO para estar listas para utilizarse en una
30 prueba, junto con el inserto de placa proporcionado. Al transportar las células en un número óptimo por depósito, y

utilizando las células junto con el inserto de la placa, se proporciona al usuario final un equipo de prueba mejorado. Con un equipo convencional. Las células son enviadas en un tubo, y una vez descongeladas, tienen que ser lavadas mediante 5 centrifugación, lo cual peletiza las células, permitiendo que se dispersen en un medio limpio. Normalmente las células son lavadas dos a tres veces en esta forma. Posteriormente las células tiene que ser contadas y resuspendidas en la densidad celular requerida antes de que puedan suministrarse dentro de 10 los depósitos. La prueba de pirógeno de la presente invención es de labor menos intensa, menos tardada y menos traumática para las células en comparación con pruebas convencionales las cuales pueden dar como resultado pérdida, activación y muerte celular.

15 Cuando se introducen elementos de la presente invención o la modalidad(s) preferida de los mismos, el artículo "un", "una", "el" y "las, los" pretenden significar que existen uno o más de los elementos. Los términos "que comprenden", "que incluyen" y "que tiene" pretenden ser inclusivos y significa que 20 pueden ser elementos adicionales además de los elementos descritos. Ya que se pueden realizar varios cambios a los métodos y composiciones anteriores sin apartarse del alcance de la presente invención, se pretende que todo el contenido en la descripción anterior, deba ser interpretado como ilustrativo y 25 no en un sentido limitante.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar pirógenos sin endotoxina en una muestra, en donde el método comprende los pasos de:

combinar un reactivo que contiene monocitos y la muestra
5 que será probada en un primer sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que comprende polipropileno, en donde el reactivo que contiene monocito comprende células mononucleares de sangre periférica o células de línea celular monocíticas, está en contacto con la
10 superficie celular, y está presente en el sistema de ensayo en una alta densidad celular.

incubar el reactivo que contiene monocito y la muestra, en donde el reactivo que contiene monocito produce una citocina y un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria;

15 transferir los contenidos de primer sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria; y

ensayar el segundo sistema de ensayo con respecto a la
20 presencia de citocina o un transmisor endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie; mediante lo cual el nivel elevado de citocina o transmisor endógeno enlazado a la superficie indica la presencia de pirógenos en la muestra probada.

2. Un método para detectar pirógenos sin endotoxina en
25 un producto médico administrado en forma parenteral que comprende los pasos de:

combinar un reactivo que contiene monocito y el producto médico que será probado en un primer sistema de ensayos que comprende al menos una superficie que comprende
30 polipropileno, en donde el reactivo que contiene monocito comprende sangre completa y está en contacto con la

superficie;

incubar el reactivo que contiene monocito y el segundo producto, en donde el reactivo que contiene monocito produce IL-6;

5 transferir los contenidos del primer sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6; y

ensayar el segundo sistema de ensayo para la presencia de IL-6 enlazado al anticuerpo en la superficie; mediante lo cual
10 un nivel elevado de IL-6 enlazado a la superficie, indica la presencia de pirógenos en el producto médico probado.

3. Un método para detectar pirógenos sin endotoxina en un producto médico administrado en forma parenteral que comprende los pasos de:

15 combinar un reactivo que contiene monocito y el producto médico que será probado en un sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que comprende polipropileno y al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6, en donde el reactivo que contiene
20 monocito comprende sangre completa y está en contacto con la superficie que comprende polipropileno; y

ensayar el sistema de ensayo para la presencia de IL-6 enlazado al anticuerpo en la superficie; mediante lo cual un nivel elevado de IL-6 enlazado a la superficie, indica la
25 presencia de pirógenos en el producto médico tratado.

4. Un método para cultivar células contenidas dentro de un reactivo que contiene monocito para utilizarse en un ensayo de pirógenos sin endotoxina que comprende los pasos de:

combinar el reactivo que contiene monocito y una muestra
30 que será probada en un sistema de ensayos que comprende al menos una superficie que comprende polipropileno, en donde el

reactivo que contiene monocito comprende células mononucleares de sangre periférica o células de línea celular monocítica, está en contacto con la superficie, y se encuentra en el sistema de ensayo en una alta densidad celular.

5 5. El método tal como se describe en la reivindicación 4, caracterizado porque el sistema de ensayo comprende al menos un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, al menos una
10 superficie del depósito comprende polipropileno, y el reactivo que contiene monocito se encuentra en dicho depósito en una alta densidad celular.

6. El método tal como se describe en la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque al menos uno del primero y segundo
15 sistemas de ensayo incluyen al menos un depósito de microtitulación, y la superficie(s) es al menos una parte del interior de la pared de microtitulación.

7. El método tal como se describe en la reivindicación 3 ó 4, caracterizado porque el sistema de ensayo incluye al
20 menos un depósito de microtitulación, y la superficie(s) es al menos una parte del interior del depósito de microtitulación.

8. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 7, caracterizado porque el depósito se forma de manera que el reactivo que contiene
25 monocito esté concentrado para proporcionar mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano.

9. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 7, caracterizado porque el
30 depósito de microtitulación comprende una región superior abierta, una región superior que se extiende hacia abajo desde

154

la parte superior abierta, y una pared del fondo que se ahusa en diámetro desde la parte de arriba del punto más bajo hasta el punto más bajo.

10. El método tal como se describe en cualesquiera de
5 las reivindicaciones de la 5 a la 7, caracterizado porque el depósito de microtitulación comprende una región superior abierta, una región que se extiende hacia abajo desde la región superior que tiene un extremo superior y un extremo de fondo, y una región inferior que tiene un extremo superior y un punto
10 más bajo, extendiéndose la región inferior desde el extremo inferior de la región superior y ahusándose en diámetro más rápidamente que la región superior del extremo superior de la región inferior hacia el punto más bajo.

11. El método tal como se describe en la reivindicación
15 9, caracterizado porque la pared superior del depósito de microtitulación es no plana, curva, parabólica o se extiende hacia abajo.

12. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 7, caracterizado porque los
20 lados del depósito de microtitulación están con pendiente hacia adentro.

13. El método tal como se describe en la reivindicación 5, caracterizado porque el sistema de ensayo comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una
25 citocina, y la superficie en la cual el anticuerpo se aplica es al menos una parte del interior del depósito de microtitulación.

14. El método tal como se describe en la reivindicación 13, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo para un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria.

30 15. El método tal como se describe en la reivindicación 14, caracterizado porque el transmisor endógeno es endotelina.

16. El método tal como se describe en la reivindicación 5, caracterizado porque comprende además el paso de ensayar el sistema de ensayo para la presencia de un transmisor de citocina o endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie; 5 mediante lo cual un nivel elevado de citocina o transmisor endógeno enlazado a la superficie, indica la presencia de pirógenos en la muestra probada.

17. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 1, 13 ó 16, caracterizado porque la citocina 10 es seleccionada del grupo que consiste en interleucina-1 (IL-1), interleucina-1ra (IL-1ra), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), y factor- α de necrosis de tumor (TNF- α).

18. El método tal como se describe en la reivindicación 17, caracterizado porque la citocina es IL-6.

15 19. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 18, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo.

20. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 18, caracterizado porque el 20 anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

21. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20, caracterizado porque el sistema(s) de ensayo es un ensayo inmunoabsorbente enlazado por enzimas (ELISA) colorimétrico, un inmunoensayo 25 radioetiquetado o un inmunoensayo etiquetado con fluorescencia.

22. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 1 o de la 4 a la 21, caracterizado porque la línea celular monocítica comprende una línea celular monocítica 30 humana.

23. El método tal como se describe en la reivindicación

22, caracterizado porque la línea celular monocítica humana es MONOMAC-6, THP-1 o 28SC.

24. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 1 y de la 4 a la 21, caracterizado porque la
5 línea celular monocítica comprende una línea celular que tiene receptores tipo CD14 y Toll endógenos o que han sido transfectados con receptores tipo CD14 y/o Toll y/o genes reporteros para transmisores inflamatorios o pirogénicos.

25. El método tal como se describe en cualesquiera de
10 las reivindicaciones 1 y de la 4 a la 24, caracterizado porque la muestra es un producto médico administrado en forma parenteral.

26. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 2, 3 y 25, caracterizado porque el producto
15 médico administrado en forma parenteral se selecciona del grupo que consiste en un producto de sangre, solución de diálisis, vacuna y expansor de plasma.

27. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 1 y de la 4 a la 26, caracterizado porque el
20 reactivo que contiene monocitos se encuentra en el sistema de ensayo en una densidad celular de al menos aproximadamente 250,000, 500,000, 600,000, 700,000, 800,000, 900,000, 1,000,000, 1,100,000, 1,200,000, 1,300,000, 1,400,000, 1,500,000, 1,600,000, 1,700,000, 1,800,000, 1,900,000 ó
25 2,000,000 células por depósito.

28. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 1 y de la 4 a la 27, caracterizado porque las células mononucleares de sangre periférica comprenden células mononucleares de sangre periférica humana.

30 29. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 2, 3, 6 a 12, 19 a 21 y 26, caracterizado

porque el reactivo que contiene monocitos comprende además un diluyente.

30. El método tal como se describe en la reivindicación 29, caracterizado porque el diluyente es un medio RPMI.

5 31. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 2, 3, 6 a 12, 19 a 21, 26, 29 y 30, caracterizado porque el reactivo que comprende monocito comprende además un anticoagulante.

32. El método tal como se describe en cualesquiera de 10 las reivindicaciones 2, 3, 6-12, 19-21, 26 y 29-31, caracterizado porque la sangre completa comprende sangre completa humana.

33. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 2, 3, 6 a 12, 19 a 21, 26 y 29 a 31, caracterizado porque el reactivo que contiene monocito se 15 encuentra en el sistema de ensayos en una densidad celular mayor a aproximadamente 100,000, 200,000, 210,000, 220,000, 230,000, 240,000, 250,000, 260,000, 270,000, 280,000, 290,000, 300,000, 310,000, 320,000, 330,000, 340,000, 350,000, 360,000, 370,000, 380,000, 390,000 ó 400,000 de 20 células mononucleares de sangre periférica por depósito.

34. Un equipo de diagnóstico que comprende:

una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de depósitos de microtitulación formados de modo que las células contenidas en cada depósito sean concentradas en 25 comparación a un depósito de microtitulación de fondo plano, una superficie del depósito que comprende polipropileno; y

un reactivo que contiene monocitos crioconservado el cual está contenido en los depósitos de la placa, en donde el reactivo que contiene monocitos comprende células 30 mononucleares de sangre periférica crioconservadas o células de línea celular monocítica crioconservada, está en contacto

con las superficies de los depósitos y se encuentra en el depósito a una alta concentración celular.

35. Un equipo de diagnóstico que comprende:

un sistema de ensayo para detectar pirógenos sin
5 endotoxina en un producto médico administrado en forma
parenteral, en donde el sistema de ensayo comprende una placa
de microtitulación que comprende una pluralidad de depósitos
de microtitulación formados de modo que las células contenidas
en cada depósito sean concentradas en comparación con un
10 depósito de microtitulación de fondo redondo, comprendiendo
una superficie del depósito polipropileno;

un reactivo que contiene monocitos crioconservado que
está contenido en los depósitos de la placa, en donde el
reactivo que contiene monocitos comprende sangre completa
15 crioconservada y está en contacto con la superficie de los
depósitos; y

un anticuerpo para IL-6.

36. Un equipo tal como se describe en la reivindicación
34 ó 35, caracterizado porque el depósito comprende además
20 una barrera que es impermeable a monocitos.

37. Un equipo tal como se describe en la reivindicación
36, caracterizado porque la barrera comprende una membrana,
una rejilla, un cernidor o un cribador.

RESUMEN

Se describe una prueba de activación de monocitos mejorada, la cual tiene mejor capacidad de detectar pirógenos sin endotoxina en productos médicos, en donde la muestra se
5 incuba con un reactivo que contiene monocitos en un sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que comprende polipropileno. La presente invención también se refiere a sistemas de ensayo para utilizarse en estas pruebas que incluyen al menos un depósito de microtitulación que tiene
10 al menos una superficie interior que comprende polipropileno y que tiene una forma tal que el reactivo que contiene monocitos se concentra en el depósito para proporcionar un mayor contacto célula con célula. La presente invención también se refiere a un equipo de diagnóstico que puede ser utilizado para
15 probar la presencia de pirógenos sin endotoxina en una muestra.

LSO

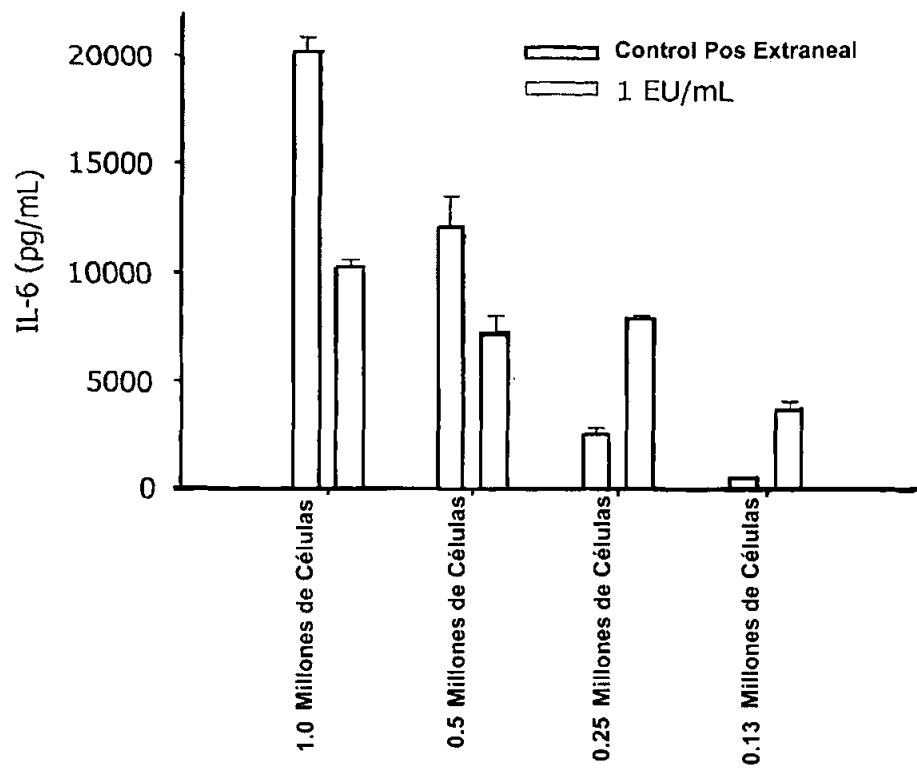


FIG. 1

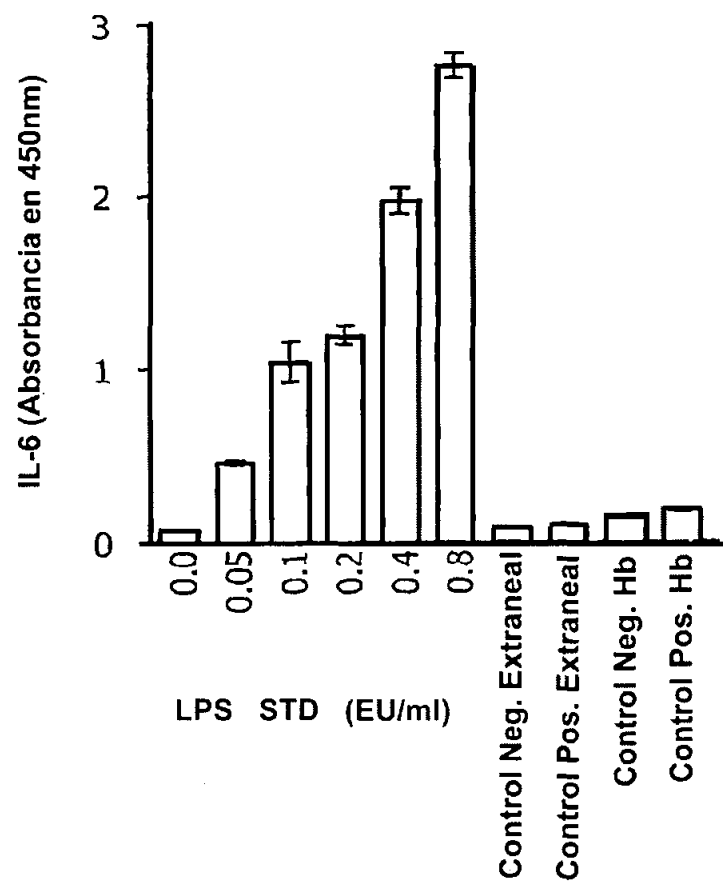


FIG. 2

14

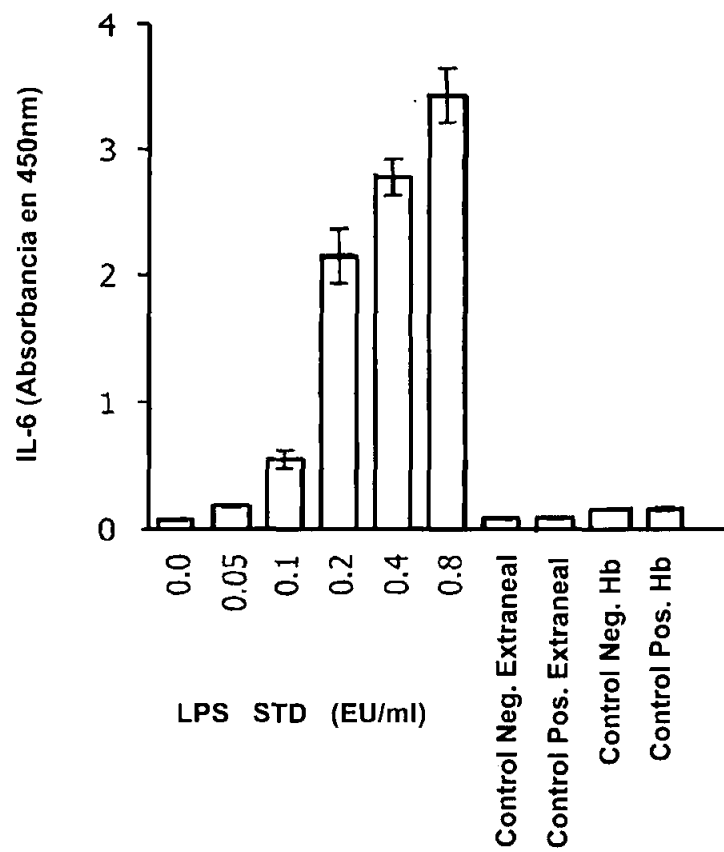
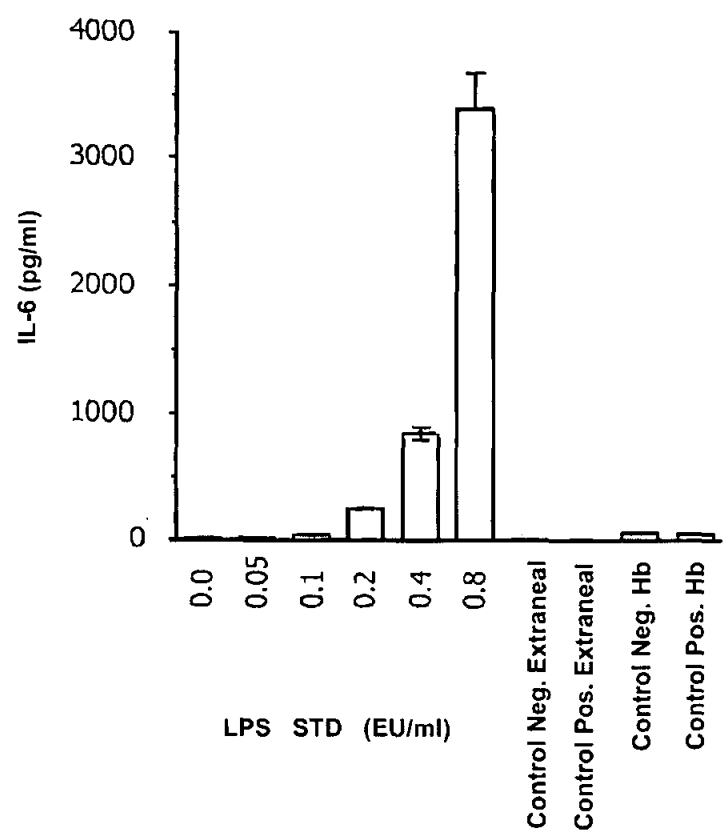


FIG. 3

FIG. 4



LS2

FIG. 5

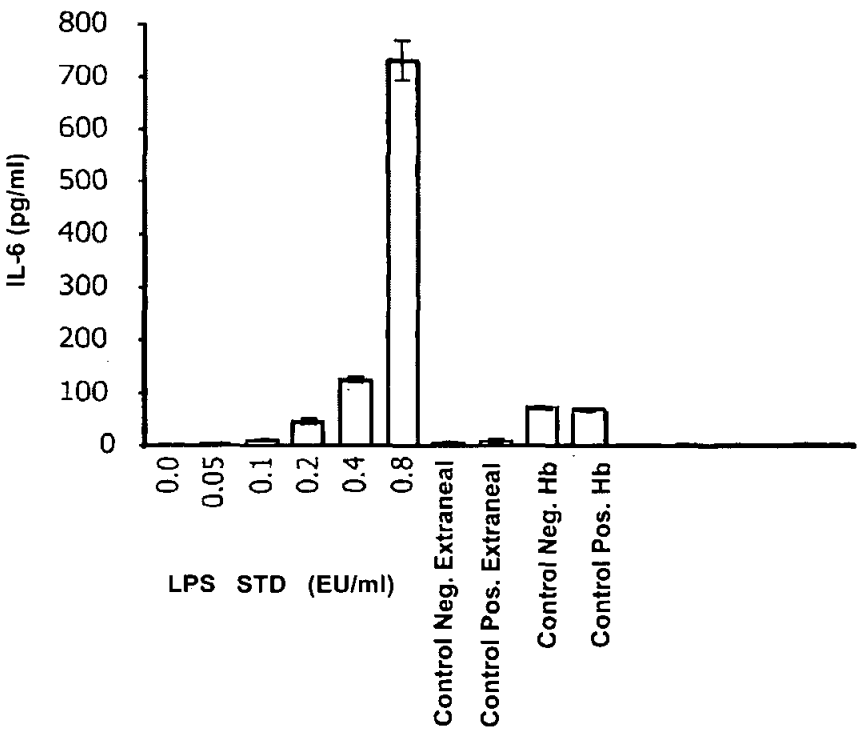


FIG. 6

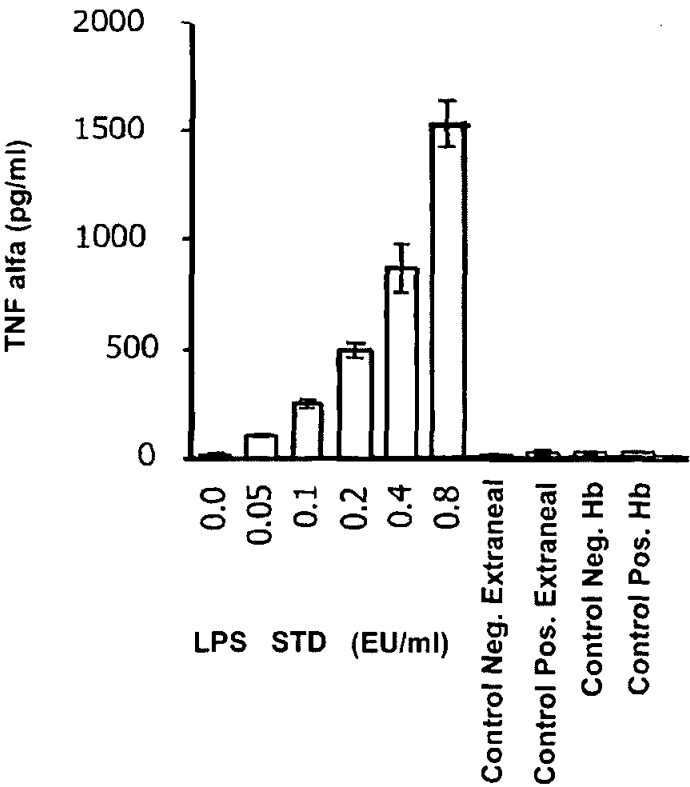


FIG. 7

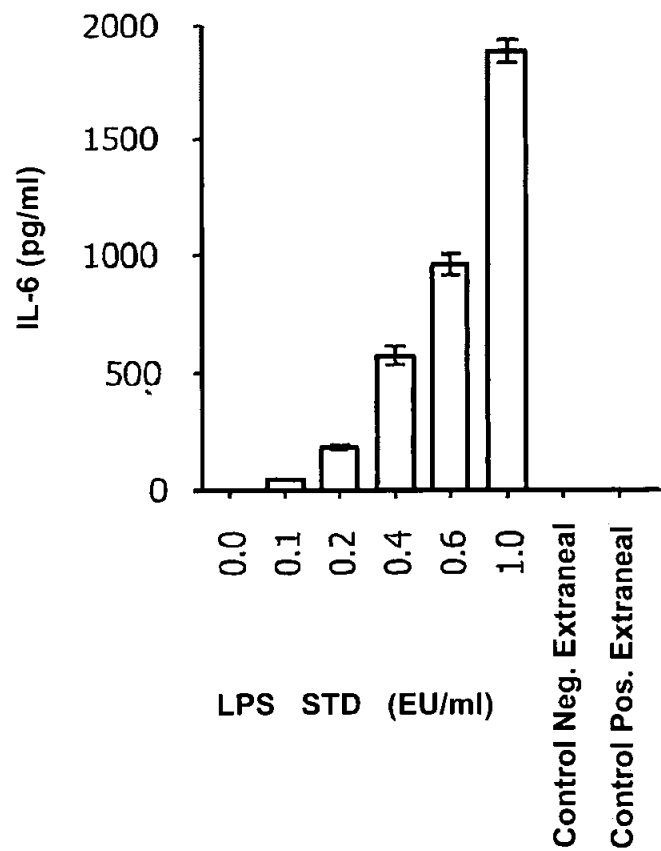
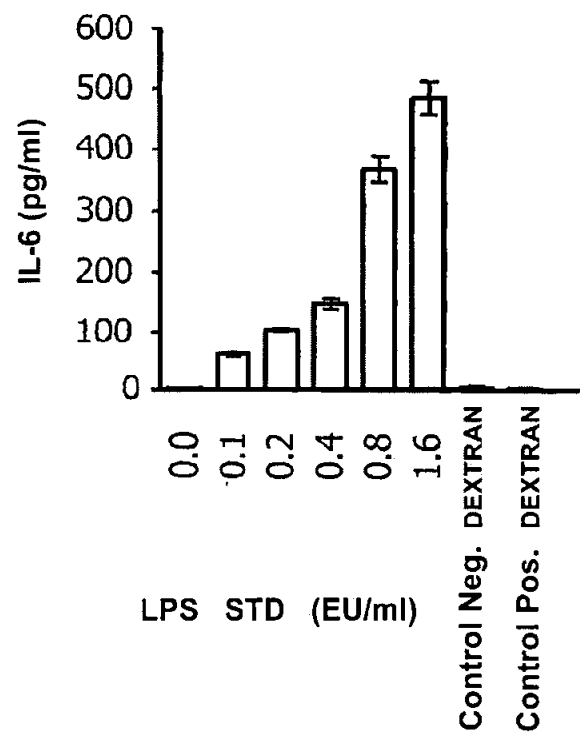


FIG. 8



LS4

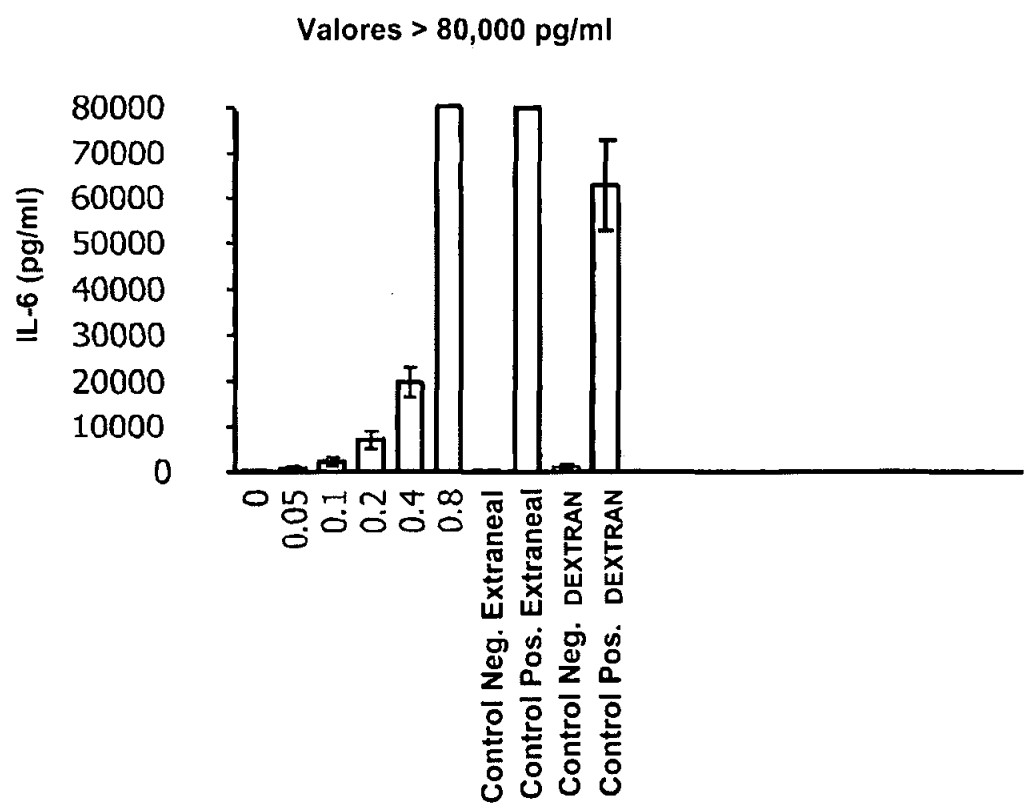
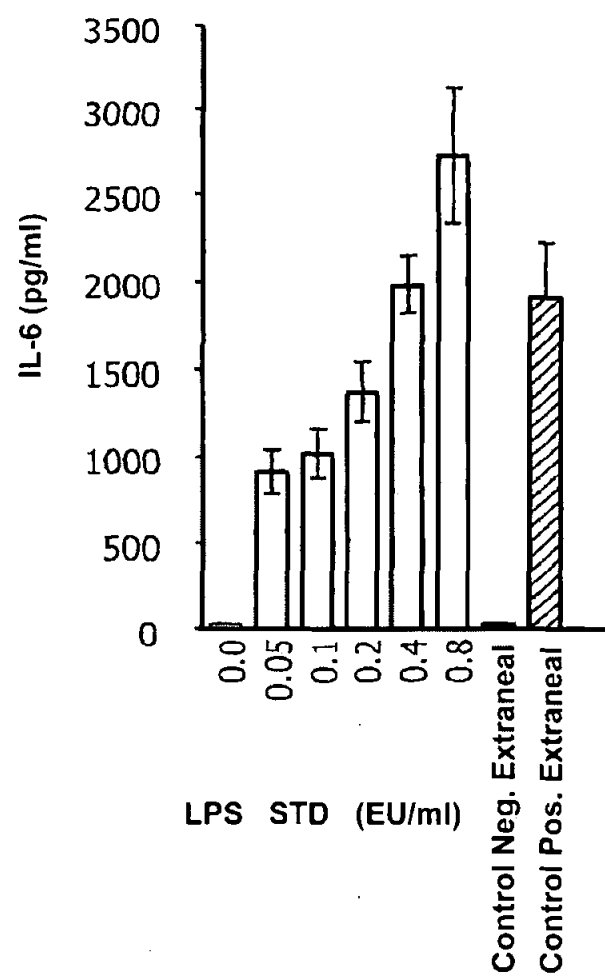


FIG. 9

FIG. 10



SS

FIG. 11A

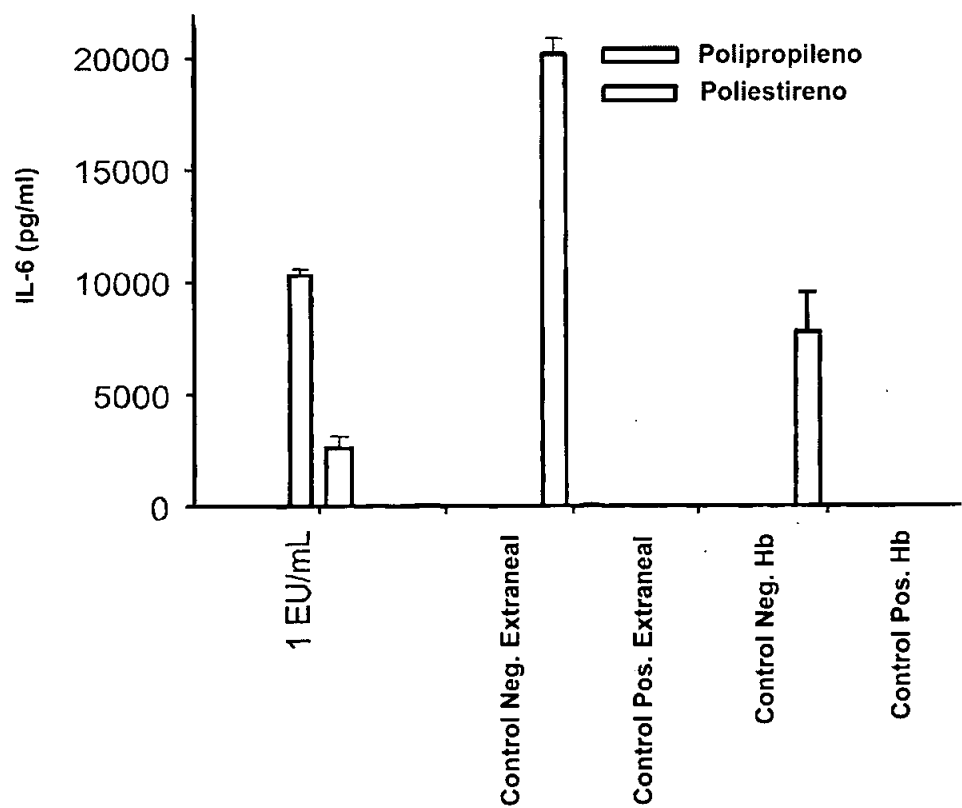


FIG. 11B

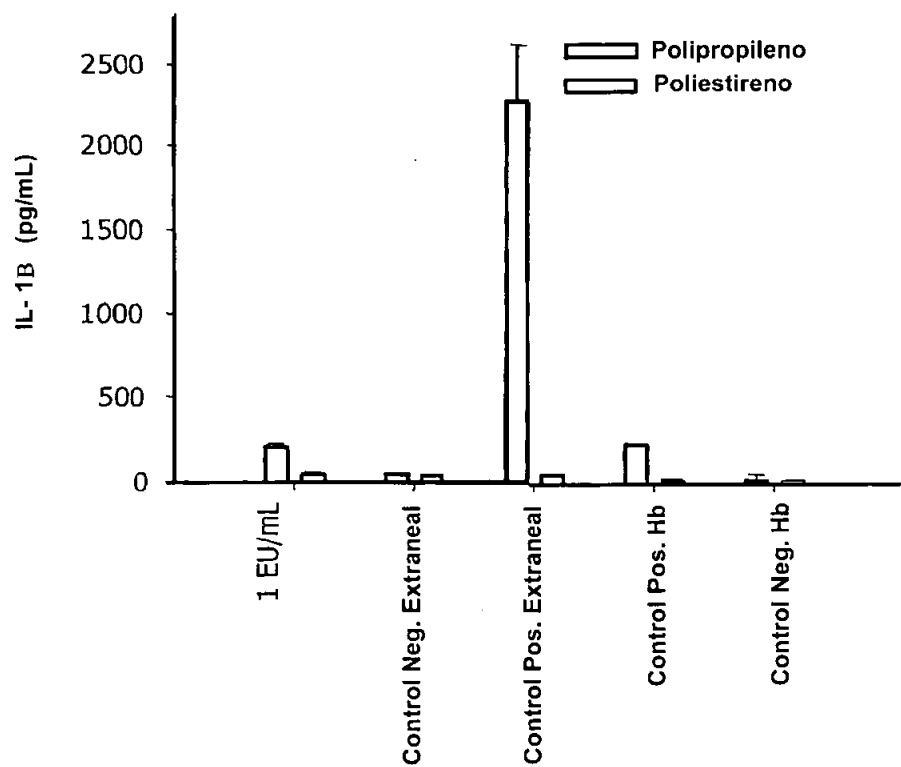


FIG. 12A

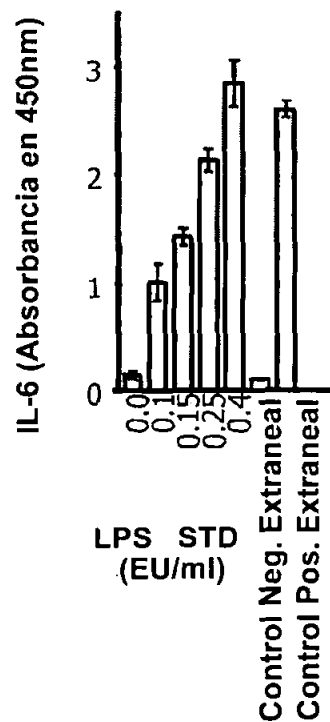
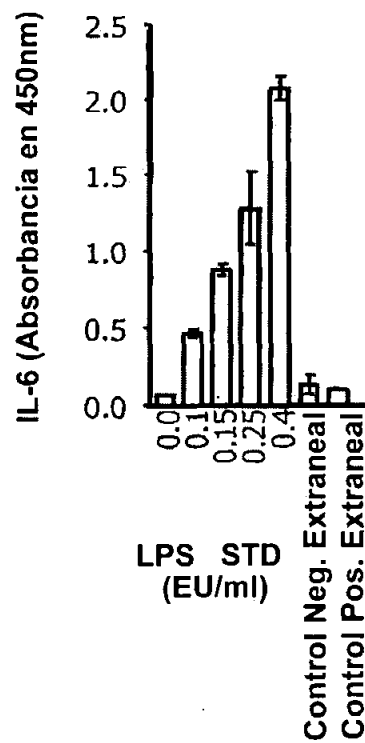


FIG. 12B



157

FIG. 13A

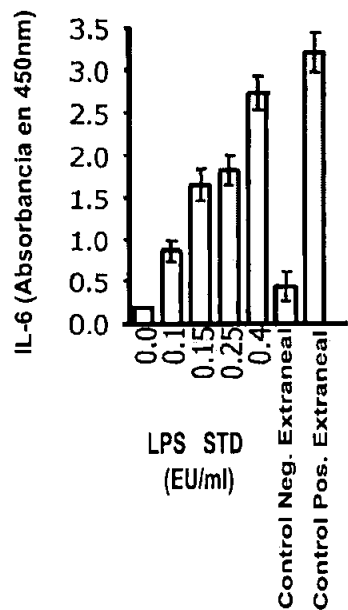


FIG. 13B

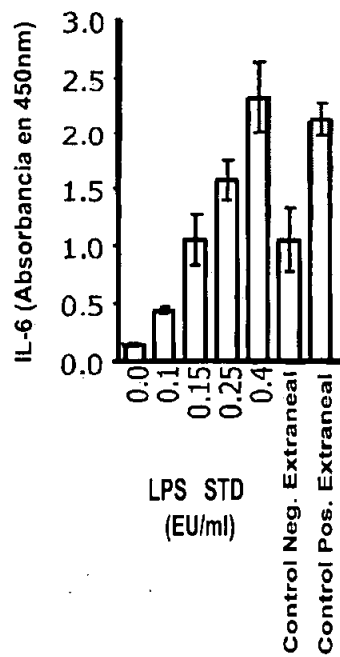


FIG. 14A

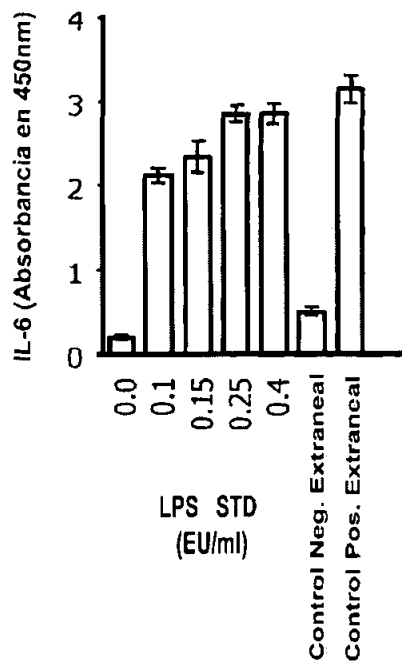


FIG. 14B

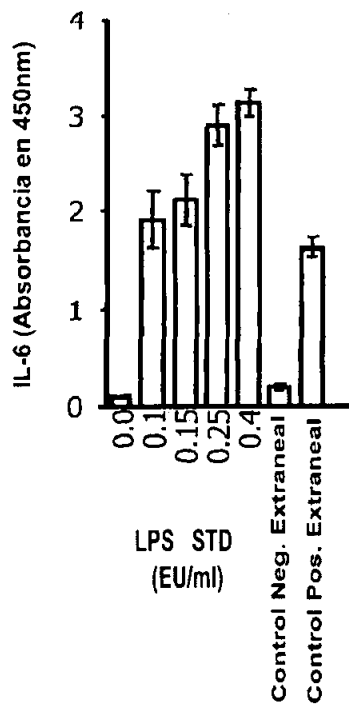
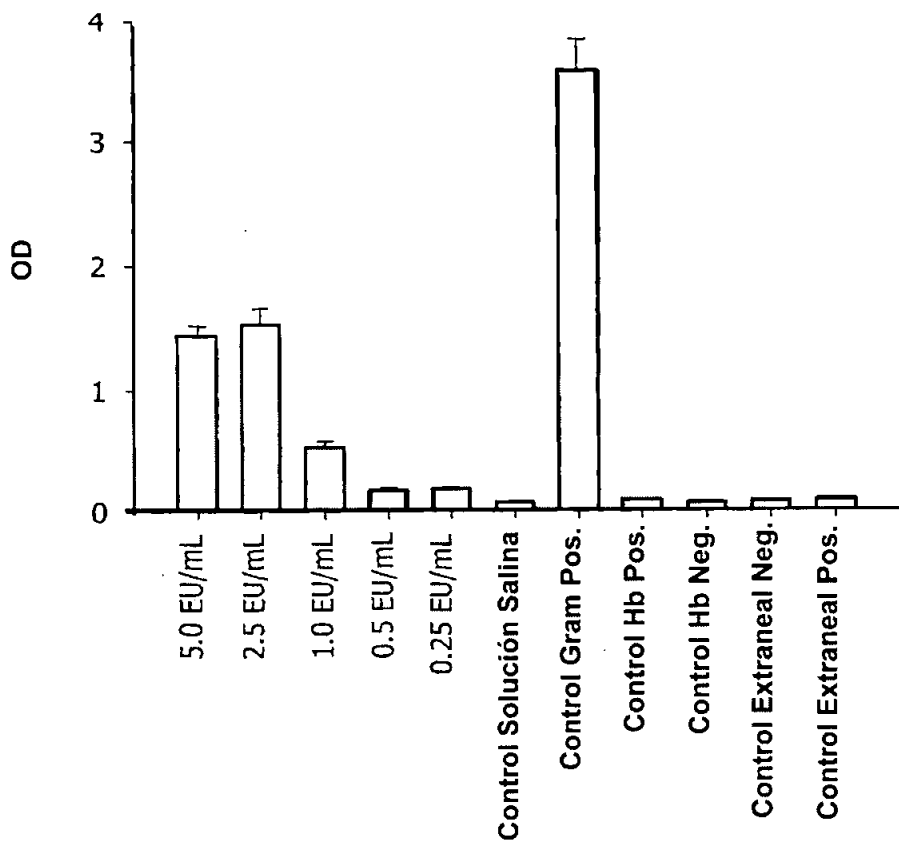


FIG. 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/062424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAGAWA YUKARI ET AL: "Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test" CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, vol. 9, no. 3, May 2002 (2002-05), pages 588-597, XP002430517 ISSN: 1071-412X cited in the application page 589, col.2, para.2 ----- -/--	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 2007

Date of mailing of the international search report

09/05/2007

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pellegrini, Paolo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/062424

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POOLE S ET AL: "A rapid 'one-plate' in vitro test for pyrogens" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 274, no. 1-2, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 209-220, XP004411950 ISSN: 0022-1759 abstract; p. 213, col.1, para.2-col.2, para.3	1-37
X	HOFFMANN S ET AL: "International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 298, no. 1-2, March 2005 (2005-03), pages 161-173, XP004853246 ISSN: 0022-1759 cited in the application para.2.4-2.9 the whole document	1-37

163

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-075690- -00000-0000

Fecha: 2008-07-22 16:13:25 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 39,887
FECHA : MAYO 19 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	1750688	19/05/2008	75,145,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
	TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 16577-841-001-0



No. 08-075690- -00000-0000

Fecha: 2008-07-22 16:13:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

SPT

Firma Responsable

Fecha

Julio 22-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

165

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	8 75690
	Solicitud internacional	PCT/US2006/062424
	Fecha inicio fase nacional	22/07/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10728

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado (por todos los solicitantes), con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPÉDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 22 AGO. 2008,
jfernand