

TÍTULO DE PATENTE NO. 245564

Titular(es):	CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.		
Domicilio(s):	Av. Instituto Politécnico Nacional, 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360, Distrito Federal, MEXICO		
Denominación:	ANTICUERPOS MONOCLONALES EN CONTRA DE ESTRUCTURAS LIPÍDICAS DIFERENTES A LA BICAPA DE MEMBRANAS CELULARES PARA DEFINIR ESTADOS FISIOLÓGICOS EN DIFERENTES TIPOS CELULARES Y PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIPARTÍCULAS LIPÍDICAS PRESENTES EN INDIVIDUOS Y/O ANIMALES CON ALGUNAS ENFERMEDADES RELACIONADAS CON ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS		
Clasificación:	Int. Cl. 8: G01N33/53; G01N33/92		
Inventor(es):	MARIA GUADALUPE ORTEGA PIERRES; SARA ROCÍO FONSECA LIÑAN.		
SOLICITUD			
Número:	Fecha de presentación:	Hora:	
PA/a/2000/008567	1 de septiembre de 2000	14:32	
PRIORIDAD			
País:	Fecha:	Número:	
ESTA PATENTE CONCEDE A SU TITULAR EL DERECHO EXCLUSIVO DE EXPLOTACIÓN DEL INVENTO RECLAMADO EN EL CAPÍTULO REIVINDICATORIO Y TIENE UNA VIGENCIA IMPRRORROGABLE DE <u>VEINTE AÑOS</u> CONTADOS A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD.			

Fecha de expedición: 3 de mayo de 2007

EL DIRECTOR DIVISIONAL DE PATENTES


QUÍM. FABIÁN R. SALAZAR GARCÍA



MX/2007/40623

245564



**“ANTICUERPOS MONOCLONALES EN CONTRA DE ESTRUCTURAS
LIPÍDICAS DIFERENTES A LA BICAPA DE MEMBRANAS CELULARES PARA
DEFINIR ESTADOS FISIOLÓGICOS EN DIFERENTES TIPOS CELULARES Y
PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIPARTÍCULAS LIPÍDICAS**

5 **PRESENTES EN INDIVIDUOS Y/O ANIMALES CON ALGUNAS
ENFERMEDADES RELACIONADAS CON ANTICUERPOS
ANTIFOSFOLÍPIDOS”**

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención está relacionada con la obtención de hibridomas
productores de anticuerpos monoclonales que reconocen lípidos, y más
particularmente, con la obtención de anticuerpos monoclonales en contra de
estructuras lipídicas diferentes de la bicapa así como con su uso para determinar
la presencia de estas estructuras en estados fisiológicos particulares de algunas
15 células, y en un sistema de detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en
muestras de individuos con enfermedades relacionadas con la presencia de
anticuerpos antifosfolípidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Existen en el estado de la técnica diversos estudios en los que se
puede encontrar evidencia de anticuerpos que reconocen lípidos.

Por ejemplo, se han detectado en el suero de enfermos del síndrome de
anticuerpos antifosfolípidos, como lo describieron Asherson y col. en su libro "El
Síndrome Antifosfolípido" en 1996 (CRC Press, Boca Raton). De igual manera, se
25 han obtenido en animales que fueron tratados experimentalmente con lípidos por



inmunización activa, de acuerdo con lo descrito por Alving en Biophys. Acta 1113:307-322), o bien, en animales que recibieron anticuerpos antifosfolípidos por inmunización pasiva, como lo describieron Tincan y Sroog en 1996 en el libro arriba mencionado.

5 Los anticuerpos anti-lípidos se han clasificado en dos grupos de acuerdo con el método que se emplea para su determinación. Estos grupos son anticuerpos anti-cardiolipina y anticuerpos anti-coagulantes.

Los anticuerpos anti-cardiolipina se detectan por métodos en donde el antígeno lipídico, la cardiolipina, es inmovilizado en una fase sólida, según lo describieron Harris y col. en 1985 (Clin Rheum. Dis. 11:591-609), como pueden ser por ejemplo los ensayos inmunoenzimáticos de fase sólida y el radio inmuno ensayo, mejor conocidos por sus siglas en inglés respectivamente como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) y RIA (radioimmuno assay), los cuales han sido ampliamente utilizados en la técnica anterior.

15 Por lo que se refiere a los anticuerpos anti-coagulantes, éstos se detectan por métodos en los que se mide *in vitro* un aumento en el tiempo de coagulación de muestras de plasma sanguíneo, de acuerdo con lo establecido por Bevers, et. al. en 1991 (Thromb. Haemost. 66:629-632), como los métodos de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), de tiempo de coagulación de Russell, de proteína C y de Proteína S, entre otros. En estas pruebas, los anticuerpos anticoagulantes se unen al lípido fosfatidiletanolamina, que es un factor intermediario en la cascada de coagulación, por lo que al disminuir la concentración de este lípido, por la reacción inmune, se aumenta el tiempo en que ocurre dicha coagulación.

25 Por lo que se refiere a los anticuerpos anti-cardiolipina, éstos tienen la



desventaja de que dan reacción cruzada con otros lípidos aniónicos, como fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol. Debido a esta falta de especificidad, a los anticuerpos antes mencionados en general se les conoce como anticuerpos antifosfolípidos.

5 También se han detectado anticuerpos contra fosfatidiletanolamina en el suero de enfermos del síndrome de antifosfolípidos, así como anticuerpos contra fosfatidilcolina en enfermos que presentan anemia hemolítica, como lo describieron Sugi y McIntyre (Blood 86:3083-3089) y Arvieux y col. (Thromb. Haemost. 74:1120-1125), respectivamente, en 1995.

10 Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la unión de los anticuerpos antifosfolípidos al antígeno lipídico aumenta en presencia de una proteína plasmática. Por ejemplo, en 1990, McNeil y sus colaboradores determinaron que la unión de anticuerpos a la cardiolipina aumenta en presencia de la β_2 -glicoproteína o apoproteína H (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:4120-15 4124).

Adicionalmente, algunos anticuerpos anti-cardiolipina se unen directamente a β_2 -glicoproteína, como lo describieron Roubey y col. en 1995 (J. Immunol. 154:954-960).

Lo anterior sugiere que los anticuerpos anti-cardiolipina pueden 20 reconocer un epítipo en la β_2 -glicoproteína que se expone en el complejo β_2 glicoproteína-cardiolipina, y que también se unen directamente con la β_2 glicoproteína, pero con muy baja especificidad, de acuerdo con Pengo y col. (1995, Thromb. Haemost. 73:29-34).

De acuerdo con los diversos estudios realizados, se puede concluir que 25 la unión de anticuerpos antifosfolípidos con otros antígenos lipídicos también está



asociada con proteínas. Sugi y McIntyre (op. cit., 1995) encontraron que proteínas llamadas cininógenos están involucradas en la unión de anticuerpos a la fosfatidiletanolamína, mientras que proteínas que se unen a fosfatidilserina, tales como protrombina, proteína C, proteína S y anexina V, han sido implicadas en la

5 unión de anticuerpos anti-coagulantes, según lo establecido en 1994 por Nakamura y sus colaboradores (Biochem. Biophys. Res. Commun. 205:1488-1493), así como por Roubey (Blood 84:2854-2867). Estos estudios indican que el antígeno de algunos anticuerpos antifosfolípidos es realmente un complejo formado por fosfolípidos y proteínas específicas. Sin embargo, en otros estudios
10 se han identificado anticuerpos anti-cardiolipina que no requieren de β_2 -glicoproteína en su reacción con la cardiolipina por el método ELISA. Tales estudios fueron realizados por McNeil y sus colaboradores en 1989 (Br. J. Haematol. 73:506-513), así como por Pengo y Biasiolo en 1993 (Thromb. Res. 72:423-430).

15 Por otra parte, anticuerpos anti-cardiolipina, purificados por cromatografía de afinidad, no presentan actividad anti-coagulante (McNeil y col., 1989; Shi y col., 1993, Blood 81:1255-1262), aunque otros estudios han demostrado que ambos tipos de anticuerpos son removidos por absorción con cardiolipina (Pengo y Biasiolo, 1993; Pierangeli, 1993, Br. J. Haematol. 85:124-
20 132).

En general de los estudios anteriormente mencionados, se puede observar que los anticuerpos antifosfolípidos que se han descrito en enfermos humanos y en animales de experimentación, tienen una especificidad hacia los antígenos lipídicos muy variada; lo cual podría atribuirse a los métodos de
25 detección de dichos anticuerpos.



En tales métodos, no se ha considerado la estructura y la asociación molecular, así como las propiedades químicas que tienen los antígenos lipídicos en la naturaleza. Por consecuencia, en los antígenos lipídicos que se han utilizado, los fosfolípidos se encuentran unidos a soportes sólidos artificiales como en los casos de ELISA y RIA, o bien, en una asociación molecular que no está caracterizada completamente, como en las pruebas de aumento del tiempo de coagulación.

Existen muy pocos estudios en los que se ha considerado la estructura molecular de los fosfolípidos al emplearlos como antígenos. Por ejemplo, los trabajos de Rauch y col. de 1989 y en 1998 (Thromb. Haemost. 62:892-896 y Thromb. Haemost. 80:936-941, respectivamente) y Berard y col. (J. Lab. Clin. Med., 1993, 122:601-605), encontraron que el suero de algunos enfermos de lupus eritematoso generalizado es inhibido en su actividad anti-coagulante por la fosfatidiletanolamina asociada en la fase tubular H_{II} y que esta inhibición no se presentó cuando el fosfolípido se encontraba asociado en bicapa. Sin embargo, las propiedades de la membrana celular no se pueden relacionar con las de fosfolípidos asociados en forma tubular, porque la asociación lipídica tubular H_{II} es prácticamente incompatible con la estructura vesicular de la membrana celular, como lo han establecido diversos autores. Es decir, en los antígenos lipídicos empleados en estos estudios, los fosfolípidos se encuentran en una forma molecular que no corresponde a la que se encuentra en las membranas celulares.

En los estudios en animales de experimentación, tratados por inmunización activa o pasiva, se aplican los métodos de detección de anticuerpos antifosfolípidos que se han descrito para el humano. Además; se analizan los diferentes órganos y tejidos por estudios anatómicos, histopatológicos, de



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

inmunofluorescencia, e incluso de pérdida fetal y consecuentemente se estudian las lesiones producidas en los fetos y en la placenta de los animales hembras en estudio. Estudios de este tipo han sido realizados por Tincani y Shoefeld (Ortiz 1996) así como por Shoefeld y Ziporen (Lupus 7: SI 58-SI 61, 1998).

5 Es conocido que la estructura molecular de la membrana plasmática de células de mamíferos es de un heteropolímero de asociación, formado por fosfolípidos, glicolípidos, colesterol, proteínas y glicoproteínas, en donde generalmente los lípidos se encuentran en la asociación molecular de bicapa. Sin embargo, también se conoce que los lípidos pueden tener una asociación
10 molecular diferente a la bicapa, y que dicha asociación depende de la geometría de los lípidos y de las condiciones a las que se encuentren los mismos.

Los fosfolípidos y glicolípidos son las únicas moléculas de las células que pueden autoensamblarse de manera espontánea en un medio acuoso y formar asociaciones moleculares específicas y constituyen del 60 al 70% de los lípidos
15 membranales. Si se toma en cuenta esta característica y la forma molecular de los lípidos se encuentra que los lípidos en forma cilíndrica, dan un arreglo de bicapa; los lípidos cónicos, se autoensamblan en forma de tubos con las regiones no polares hacia afuera y las regiones polares hacia adentro, a este tipo de asociación molecular se le ha denominado de fase hexagonal II (H_{II}) (De Kruijff, 1987. Nature
20 329:587-588; Rauch y Janoff, 1990. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 87:4112-4114; Baeza y col., 1995. Biochem Cell Biol. 73:289-297). Los lípidos con forma de cono invertido, dan una asociación micelar, en donde las regiones polares están ubicadas hacia afuera y las regiones no-polares están situadas hacia el interior de la micela. Los lípidos de forma cónica y de cono invertido representan del 30 al 40% de los
25 lípidos membranales.



En 1980 el grupo de Cullis propuso el modelo del mosaico membranoso (Cullis y col., 1980: 1991), para tratar de explicar las funciones que pueden tener las diferentes asociaciones moleculares en que pueden encontrarse los lípidos en las membranas celulares. En este modelo se considera que la matriz membranosa está constituida por lípidos cilíndricos asociados en bicapa, mientras que los lípidos cónicos de manera general, también se encuentran en el arreglo molecular de bicapa debido a la presencia de los lípidos cilíndricos que estabilizan esta asociación, pero se propone que los lípidos cónicos podrán formar arreglos de no-bicapa de manera transitoria cuando son inducidos a agregarse a estas asociaciones por diferentes moléculas. Además, en este modelo se propone que las asociaciones de no-bicapa o partículas lipídicas podrían participar en funciones celulares como transporte de iones y moléculas polares a través de la membrana celular, en puntos de conexión entre vesículas membranales, en procesos de fusión de membranas, como la endo y la exocitosis, en la inserción de proteínas polares en la membrana, en la formación de compartimentos y en la formación de poros a través de la bicapa que pueden permitir el paso de moléculas polares (Cullis y col., 1980; De Kruijff 1987; Cullis y col., 1991).

De igual manera, es conocido que en presencia de cationes divalentes, de fármacos, como la cloropromacina y la procainamida, de péptidos no-polares, de proteínas tales como la del bacteriófago M13, del colesterol, de iones lantano, así como de cambios de temperatura y de pH, los lípidos cónicos forman asociaciones moleculares diferentes a la bicapa, las cuales son de naturaleza transitoria, porque cuando disminuye la concentración de los factores que inducen su formación, o disminuye la temperatura o cambia el pH, los lípidos cónicos regresan a la asociación de bicapa, la cual se observa como una superficie lisa en análisis de criofractura (Turnois, et al, 1990. Chem. Phys. Lipids. 57:327-340).



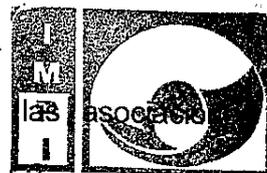
Las estructuras lipídicas H_{II} y micelar, así como cualquier estructura lipídica que no forme una bicapa, se consideran, para los fines de la presente invención, como estructuras lipídicas diferentes a la bicapa, o bien, como partículas lipídicas, independientemente de la naturaleza de los lípidos que las forman.

Los lípidos en general son moléculas poco inmunogénicas (Hughes, y col., 1986. J. Reumatol., 13(3)486-489; Alarcón-Segovi, 1991. Sem. Clin. Immunol., 1:11-19), y de las dos asociaciones moleculares que pueden presentar los lípidos en las membranas, se considera que la de bicapa será la menos inmunogénica porque es la que constituye la matriz membranal (Kleinfeld, 1991. Membrane Fusion. Ed. Jan W. Dic H. Inc. New York, p.p. 3-33).

Sin embargo, se sabe que estas estructuras lipídicas, estabilizadas con cationes divalentes, inducen la formación de anticuerpos que reconocen a los lípidos asociados en partículas lipídicas y no reaccionan con lípido en bicapa (Aguilar, 1994. Tesis de Maestría).

En relación con lo anterior, Baeza y col., en 1995 (Biochem. Cell Biol. 73:289-297), reportaron la elaboración de liposomas con arreglos estructurales diferentes a la bicapa, así como una actividad antigénica de los mismos al obtener anticuerpos policlonales. Por medio de análisis citofluorométricos de la reacción inmune se pudo identificar la presencia de estructuras lipídicas en los liposomas ahí descritos, utilizando para ello anticuerpos policlonales anti-partículas lipídicas obtenidos de sueros de ratones.

No obstante lo anterior, la inmunización de los ratones se realizó mediante la introducción de partículas lipídicas formadas artificialmente de forma que un exceso de partículas lipídicas provocará la reacción inmune deseada (Nilsson et al; 1987. J.



Immunol, Methods 99:67-75). Hasta la fecha, se cree que las moléculas diferentes a la bicapa o partículas lipídicas, también serían poco inmunogénicas cuando se encuentran presentes en la naturaleza, por ejemplo en células de humanos y animales, debido a que son transitorias y por ello no serían detectadas por el sistema inmune.

Adicionalmente, del análisis del conjunto de los estudios arriba mencionados, se puede observar que la cardiolipina es el único lípido que por sí mismo ha podido reaccionar con anticuerpos presentes en pacientes que presentan síndrome antifosfolípidos o enfermedades relacionadas con el mismo, y que los fosfolípidos normalmente presentes en la membrana celular arriba mencionados, requieren estar asociados con proteínas para reaccionar con los anticuerpos de dichos pacientes, o bien, requieren estar asociados en un arreglo molecular incompatible con la membrana celular (Hughes, 1991. Sem. Clin. Immunol. 1:5-9).

A este respecto, la presencia en sueros de pacientes con el síndrome antifosfolípidos de anticuerpos anti-cardiolipina, un lípido mitocondrial, de anticuerpos anti-nucleares y de anticuerpos anti-DNA, es indicativo de la existencia de eventos previos que causan daño en las membranas, con el rompimiento de las células y la exposición de los componentes intracelulares al sistema inmune, provocando la reacción correspondiente y, por lo tanto, el síndrome (Asherson y col., 1996. J. Rheumatol. 15(2) 1742-1745; Hughes, 1991. Sem. Clin. Immunol. 1:5-9). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios que permitan determinar cuáles son los eventos que provocan el rompimiento de la membrana celular. En este contexto se proponen dar hipótesis que podrían explicar la formación de anticuerpos antifosfolípidos.

La primera es que factores aun no descritos, provocan la destrucción de



la membrana celular, lo cual promueve la formación de partículas lipídicas a partir de los lípidos membranales que entran en contacto con el sistema inmune con los componentes intracelulares, con la consecuente formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas, anticardiolipina y antinucleares.

5 La segunda hipótesis, consiste en suponer que las partículas lipídicas se forman en la membrana celular antes de su destrucción, por lo que se formarían anticuerpos anti-partículas lipídicas que destruirían la membrana, exponiendo a los componentes celulares al sistema inmune y dando lugar posteriormente a la formación de anticuerpos anticardiolipina y antinucleares.

10 Hasta la fecha, ninguna de las dos hipótesis ha sido demostrada, por lo que el contar con un sistema que permita detectar los arreglos de no-bicapa de los fosfolípidos cónicos en la membrana celular, es imprescindible. Por esta razón se propuso un método para la obtención de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos en contra de estructuras lipídicas diferentes a la bicapa de
15 membranas celulares. Estos anticuerpos monoclonales constituyen un reactivo biológico muy específico e insustituible para la detección inequívoca de los arreglos de no-bicapa en sistemas no celulares (liposomas) y celulares, ya que los anticuerpos policlonales que puedan obtener en contra de estas estructuras pudieran dar reacciones no específicas. Por otro lado en la producción de anticuerpos
20 monoclonales se pueden emplear liposomas en las cuales es posible reproducir los arreglos moleculares que los lípidos pueden tener en las membranas celulares (Baeza y col., *op. cit.*, 1994; Ibañez, y col., *op. cit.*, 1996). Asimismo en los liposomas se puede controlar su composición lipídica e inducir cambios de las asociaciones moleculares lipídicas y ya que no contienen proteínas los anticuerpos monoclonales
25 que se obtengan solo reconocen las asociaciones de no-bicapa.



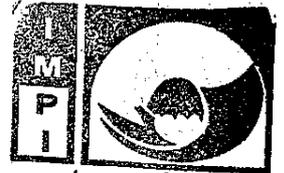
Por otro lado, se propone el uso de los anticuerpos monoclonales con indicativo inequívoco y control positivo necesariamente incluyente en un sistema de detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en muestras biológicas de individuos que presentan enfermedades relacionadas con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos. Así mismo, la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas se puede también realizar de acuerdo con el esquema descrito para humanos, plantas y en animales de experimentación en los cuales se induce la formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

Tomando en cuenta que la detección específica de arreglos de no-bicapa de los fosfolípidos cónicos en las membranas celulares es muy necesaria para determinar los procesos metabólicos en los que pudieran participar, así como los factores que los inducen y estabilizan de tal forma que sean reconocidos por el sistema inmune como auto antígenos e induzcan auto-anticuerpos en individuos con enfermedades que se relacionan con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, es un objeto de la presente invención el obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que reconozcan específicamente las asociaciones moleculares lipídicas de no-bicapa formados por diferentes lípidos cónicos.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para la obtención de anticuerpos monoclonales específicos en contra de estructuras lipídicas diferentes a la bicapade membranas celulares.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar estos anticuerpos para la detección de asociaciones moleculares lipídicas de no-bicapa formadas por diferentes lípidos cónicos en las membranas de células animales y de plantas que



presenten estados fisiológicos particulares.

Como otro objeto más de la presente invención, se proporcionan los elementos biológicos específicos necesarios (anticuerpos monoclonales, liposomas, liposomas lipídicos) para la detección de anticuerpos anti-partículas

5 lipídicas en etapas tempranas de enfermedades en humanos y/o animales que se relacionen con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, así como en modelos experimentales, como ratones, en los que se desarrollen por cualquier método anticuerpos antifosfolípidos.

La presente invención proporciona como objeto adicional un kit o un
10 instrumento de diagnóstico in vitro para la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en etapas tempranas de enfermedades que presentan tales anticuerpos en animales, plantas y humanos.

La presente invención tiene además el objeto de proporcionar composiciones farmacéuticas que contienen cantidades terapéuticamente efectivas
15 de los anticuerpos monoclonales para el tratamiento de enfermedades relacionadas con anticuerpos anti-partículas lipídicas, mediante el bloqueo de anticuerpos anti-partículas lipídicas o mediante la estabilización de membranas celulares. Así también como sus usos y aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de dichas enfermedades.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Otras particularidades y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, de los objetivos y modalidades preferidas, de las reivindicaciones anexas y de las figuras que se acompañan, en donde:

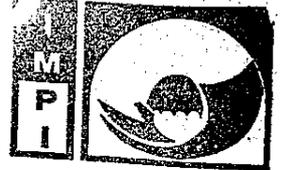
La figura 1 muestra un análisis electroforético en geles de poliacrilamida
25 en presencia de dodecil sulfato de sodio. (Los anticuerpos monoclonales se



precipitan con ácido bórico, los anticuerpos precipitados se añaden a una solución de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, el peso molecular de las proteínas que se emplean como estándares se especifican en la misma figura.

La figura 2 A y B representa la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas por el método de ELISA liposomal. A) Liposomas unilamelares conteniendo PC/PA 2:1 se incuban con regulador TBS (10mM TRIS HCl y 1 mM NaCl pH7) solamente o el mismo regulador adicionado con 5mM de $MnCl_2$ o 3mM $CaCl_2$. Estos liposomas se emplearon como antígeno en ELISA liposomal (ver descripción). Los sobrenadantes conteniendo los anticuerpos monoclonales se emplearon sin diluir o diluidos 1:2. Los liposomas fueron probados empleando anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales de un ratón BALB/c inmunizado con partículas lipídicas o con un anticuerpo monoclonal de isotipo IgM de especificidad para antígenos de *T.spiralis* (Ortega-Pierres y cols). La absorbancia de la reacción en los pozos se determina a 492 nm. B) Los lípidos preparados de L- α ácido fosfatídico y L- α fosfatidilcolina y cardiolipina se emplearon como antígenos en un ensayo de ELISA para probar la reactividad de los anticuerpos monoclonales y policlonales contra partículas lipídicas, la absorbancia de los pozos de la inmunoplaaca se determinó a 492 nm.

La figura 3 representa la inmunoreactividad del anticuerpo monoclonal H308 con las células C5337 de cáncer de páncreas humano. Las células se incuban con el anticuerpo monoclonal y con el segundo anticuerpo conjugado a FITC y se observan por microscopía de fluorescencia (A) y por microscopía de interferencia de Nomarski (B). Los números indican: (1) puntos de fluorescencia por encima del núcleo celular, (2) posibles zonas de unión entre células y (3) células de morfología redonda. Las fotografías se tomaron con un objetivo de 20X.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo a lo descrito anteriormente, la presencia de partículas lipídicas en las membranas celulares puede ser transitoria o puede ser más estable en condiciones patológicas o deficientes que se presenten en un individuo. Si este hecho ocurre es posible que las asociaciones de no-bicapa puedan ser inmunogénicas y así inducir la formación de anticuerpos con los daños consecuentes en las membranas de las células y tejidos, en las cuales se presentan dichas asociaciones. En este contexto se hace necesario detectar la presencia de arreglos moleculares de no-bicapa formados por fosfolípidos cónicos en las membranas celulares en estados fisiológicos particulares, determinar los procesos metabólicos en los que pudieran participar y los factores que las pueden inducir y estabilizar.

Asimismo resulta importante poder detectar los anticuerpos que se produzcan en animales de experimentación y en humanos que cursan enfermedades relacionadas con la producción de anticuerpos antifosfolípidos.

En este último contexto mediante el empleo de un modelo experimental en ratones BALB/c, que fueron inmunizados con partículas lipídicas, se pudo detectar la producción de anticuerpos anti-partículas lipídicas en una etapa temprana después de iniciada la inmunización de los animales. Es importante señalar que la detección de estos anticuerpos solo fue posible mediante el uso de los anticuerpos monoclonales específicos en contra de partículas lipídicas (Aguilar y col. J. Biol. Chem. 274; 25193-25196) y de un sistema de ELISA liposomal (Baeza y col., 1995. Biochem. Cell Biol., 73:289-297).

Estos anticuerpos se detectaron antes que los producidos hacia cardiolipina, que el anticoagulante lúpico y que anticuerpos antinucleares. Estos datos sugieren que los anticuerpos anti arreglos de no-bicapa al presentarse en



etapas tempranas después de la inmunización constituyen la primera fase en el desarrollo de las manifestaciones clínicas en los ratones inmunizados. Estos animales desarrollaron alopecia y lesiones en ala de mariposa semejantes a los descritos para algunas enfermedades autoinmunes en humanos así como depósitos de complejos inmunes y alteraciones patológicas de diferentes órganos.

Cabe señalar que para los fines de la presente invención, se entiende por enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos a cualquier enfermedad que presente anticuerpos antifosfolípidos en cualquier etapa de desarrollo. Algunas de tales enfermedades se mencionan a continuación, de manera enunciativa, más no limitativa: síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) primario o secundario; enfermedades autoinmunes tales como la vasculitis, la artritis reumatoide y el lupus eritematoso generalizado (LEG); enfermedades que provocan un aumento en la división celular, como pueden ser neoplasias del tipo del carcinoma en el hígado u ovario, linfomas, leucemias o desórdenes mieloproliferativos; infecciones virales como la mononucleosis infecciosa y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida; enfermedades producidas por bacterias, como la sífilis; y, enfermedades producidas por protozoarios como la malaria.

Adicionalmente, la presencia de anticuerpos antifosfolípidos se ha relacionado con el infarto al miocardio y senectud (Galli y col., 1990), por lo que la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas también permite establecer estados fisiológicos celulares, en donde los estados fisiológicos celulares estarán comprendidos dentro del concepto de enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos para los fines de la presente invención.

A continuación se dan a conocer los métodos utilizados para los



propósitos y finalidades de la presente invención, los cuales se consideran dentro del alcance de protección del invento reclamado.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es la obtención de hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales específicos que reconozcan

5 las asociaciones moleculares lipídicas de no bicapa, formadas por diferentes lípidos cónicos. Para ello se emplean ratones singénicos de la cepa BALB/c hembras de 2 meses de edad. A partir de los ratones inmunizados, es posible obtener los anticuerpos monoclonales por medio de cualquier medio conocido, preferiblemente mediante la fusión de células P3X63 Ag8U.1 de origen murino con
10 células de bazo de ratón inmune empleando polietilenglicol para la fusión celular con la consecuente obtención de un hibridoma. En una modalidad específica el hibridoma se obtiene de acuerdo con las siguientes etapas:

A) Una primera etapa de inmunización de ratones por vía intraesplénica con una dosis efectiva de lípidos como liposomas de
15 fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1), en donde dichos liposomas contienen partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} .

B) Una segunda etapa de inmunización de ratones por vía intraperitoneal con los mismos liposomas y con la misma dosis que los utilizados para la primera etapa de inmunización.

20 C) Una tercera etapa de inmunización de ratones por vía intravenosa con la dosis de liposomas utilizada en la primera etapa de inmunización.

D) Una etapa de fusión de células de bazo de los ratones inmunizados como se describió anteriormente con un mieloma de
25 ratón denominado P3X63 Ag8U.1 derivado de la línea P3X63 Ag8.



obtenida por Kohler y Milstein del mieloma MOPC21 BALB/c hembras. Esta línea no sintetiza cadenas gamma pero produce cadenas kappa. Esta fusión realizandose por lo menos cuatro días después de la etapa de inmunización por

5 intravenosa para obtener por lo menos un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas.

E) Una etapa de selección de hibridomas que presenten inmunorreacción aceptable mediante la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas generados por los mismos por medio de
10 citofluorometría y/o el método de ELISA.

En una modalidad adicional, la primera etapa de inmunización comprende administrar los liposomas por lo menos 2 veces con intervalos de 1 semana, y la segunda etapa de inmunización comprende introducir los liposomas
15 por lo menos 4 veces con intervalos de 2 semanas, mediante el método descrito por Nilsson y col. en 1987. (J. Immunol. Methods, 99, pág. 67-75).

En otra modalidad adicional, los ratones utilizados para la inmunización se seleccionan de cepas singénicas, preferiblemente utilizándose ratones de la cepa BALB/c hembra de 2 meses de edad.

20 En una modalidad preferida de la presente invención, las células de bazo se obtienen según lo descrito por Ortega-Pierres y col. (1984. Parasitology, 88:359-369), mediante la disgregación del bazo del ratón en un medio de cultivo celular específico para cultivo de hibridomas Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM Hibrimax), preferiblemente incompleto, seguido de diversas etapas de purificación y
25 una lisis de los eritrocitos, preferiblemente mediante cloruro de amonio.



El hibridoma obtenido mediante el método anteriormente mencionado se depositó en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur en París, Francia de acuerdo con lo establecido en el Tratado de Budapest para el depósito de material biológico en materia de patentes, quedando registrado dicho hibridoma, y por consiguiente, el anticuerpo monoclonal que se produce del mismo, bajo el depósito CNCM H308 I-2537.

Por lo que se refiere al método para realizar la fusión, se utiliza preferiblemente el descrito por Ortega-Pierres y col. (op. cit., 1984), que consiste en utilizar las células de bazo y de mieloma con una viabilidad mayor al 85%, las cuales se centrifugan y se mezclan en una proporción celular 1:1, para ser posteriormente sometidas a la acción del agente fusionante polietilenglicol 4000 y después de ser lavados se cultivan en placas de cultivo celular previamente sembradas con macrófagos. En relación con el método de selección, se emplea preferentemente ELISA para identificar las clonas productoras de anticuerpo monoclonal. Después de la selección, las clonas positivas se expanden *in vitro* e *in vivo* (inoculación de animales) para la obtención de anticuerpos monoclonales.

En una modalidad particular de la invención se incluye un método para la caracterización de los anticuerpos monoclonales que reconocen asociaciones moleculares lipídicas de no bicapa en cuanto al isotipo y especificidad.

En la tipificación de los anticuerpos monoclonales se emplea un sistema inmunoenzimático comercial (Boehringer Mannheim) que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo el desarrollo de la técnica.

Regulador para el pegado del antígeno, regulador de lavados, detergente, anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón IgA, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM y anticadenas ligeras gamma y kappa todas conjugadas a peroxidasa,

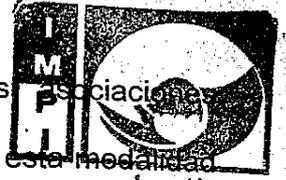


dicho método está caracterizado por las siguientes etapas:

- A) En una primera etapa, en sobrenadantes de los cultivos de hibridomas se diluyen 1:10 en regulador de lavado y se agregan 50 μ l de estas diluciones a cada pozo de la inmunoplaaca.
- 5 B) En una segunda etapa, se lleva a cabo una incubación de las placas por 30' a 37°C.
- C) Una etapa de eliminación de la solución preferentemente por succión y lavado de la inmunoplaaca.
- D) En la tercera etapa se agregan 200 μ l del regulador de lavado y las placas se incuban 15' a 37°C.
- 10 E) Una etapa de lavado de las placas con regulador de lavado y succión de esta misma.
- F) Una cuarta etapa en la que se agregan a cada pozo 50 μ l de los anticuerpos conjugados a peroxidasa en dilución 1:10, incubándose a 37°C por 30'.
- 15 G) Una etapa de lavado de las placas con regulador de lavado y succión de la misma.
- H) Una quinta etapa en la que se agrega una cantidad efectiva de la solución del sustrato de la peroxidasa incubandose a 37°C por 30' por medio de una cantidad efectiva de ácido sulfúrico.
- 20 I) Una etapa de análisis de las placas en un equipo de lectura de ELISA preferentemente a 492 nm.

El empleo de la metodología da como resultado la tipificación de los anticuerpos monoclonales como de la clase IgM.

25 En una modalidad preferida se determina la especificidad de los

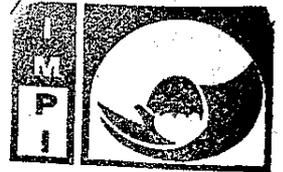


anticuerpos monoclonales y policlonales que reconocen las asociaciones moleculares lipídicas de no bicapa mediante ELISA liposomal en esta modalidad se incluye un anticuerpo monoclonal del isotipo IgM con especificidad totalmente diferente a la de los anticuerpos monoclonales en contra de partículas lipídicas.

5 El ensayo de ELISA se lleva a cabo empleando liposomas que tienen L- α fosfatidilcolina y L- α ácido fosfatídico de acuerdo al método descrito para ELISA liposomal, en esta modalidad se empleó el sobrenadante de hibridomas que contiene anticuerpos monoclonales en contra de asociaciones lipídicas sin diluir o una dilución 1:2, los sueros colectados de animales inmunizados con
10 partículas lipídicas se diluyen 1:50.

Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales presentan una reactividad mayor con las estructuras de no bicapa inducidas por Mn²⁺, mientras que el anticuerpo policlonal se une con menor avidez y reconoce a las estructuras de liposomas lisos. El anticuerpo monoclonal no específico no muestra
15 ninguna reacción con liposomas lisos o que tienen una estructura de no bicapa. Debido a que en los ensayos de rutina para medir anticuerpos antifosfolípidos se utilizan placas cubiertas con lípidos disueltos en etanol se determinó la unión del anticuerpo monoclonal a fosfolípidos purificados como L- α fosfatidilcolina, L- α ácido fosfatídico y cardiolipina. Los resultados muestran que el anticuerpo
20 monoclonal no interacciona con placas cubiertas con estos lípidos mientras que el anticuerpo policlonal si lo hace. Estos resultados sugieren fuertemente que los anticuerpos monoclonales interaccionan con superficies de lípidos no planos.

En una modalidad preferida de la purificación de anticuerpos monoclonales se emplea el método de precipitación con ácido bórico de los
25 anticuerpos monoclonales presentes en el ascitis de animales inoculados con los



hibridomas, caracterizado por las siguientes etapas:

A) Una primera etapa consiste en agregar ácido bórico (2%) a un líquido ascítico que contiene los anticuerpos monoclonales. En esta etapa se agregan, por cada 20 ml de ácido bórico, 2 ml del líquido ascítico

y se agita la solución por 2 hrs en un baño de hielo para permitir la precipitación de las inmunoglobulinas.

B) En una segunda etapa la suspensión se centrifuga a 45,000 X g por 20 min. a 4°C.

C) En una tercera etapa el precipitado de anticuerpos monoclonales se resuspende en un volumen mínimo de solución salina de fosfatos.

D) En una cuarta etapa la solución conteniendo el anticuerpo se dializa exhaustivamente con solución salina de fosfatos para eliminar el exceso de ácido bórico.

E) En una quinta etapa se determina la cantidad de proteína en la solución que contiene los anticuerpos, preferentemente mediante el método de Lowry (Lowry et al, 1951. J. Biol. Chem. 193-265-275).

F) En una sexta etapa la proteína se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) por el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970. Nature, 227:680-685). Figura 1.A y B.

Otro aspecto de la presente invención es un método para determinar si un sujeto que no presenta anticuerpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico, anti-ADN o antinucleares, tiene una enfermedad relacionada con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, en donde dicho método comprende detectar de manera directa o indirecta la presencia o ausencia de antígenos que contienen



partículas lipídicas en una muestra del sujeto; y observar si las partículas lipídicas son o no detectadas; en donde la presencia de las partículas lipídicas indica que el sujeto está desarrollando una enfermedad relacionada con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos.

5 En una modalidad preferida, la detección de las partículas lipídicas se realiza de manera indirecta mediante el uso de un antígeno que contiene partículas lipídicas que se hace reaccionar con suero del sujeto con la finalidad de determinar si en dicho suero existen anticuerpos anti-partículas lipídicas, tal determinación, realizándose preferiblemente mediante el uso de por lo menos una

10 técnica seleccionada entre citofluorometría, inmunofluorescencia y ELISA. En una modalidad específica, el antígeno que contiene partículas lipídicas se selecciona entre células neoplásicas y liposomas, en donde los liposomas se forman a partir de por lo menos un lípido susceptible de cambio de geometría por medio de cambios de temperatura, presencia de iones divalentes y/o presencia de fármacos,

15 dicho lípido siendo preferiblemente seleccionado entre fosfatidato; cardiolipina; fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol; fosfatidilcolina; fosfatidilserina; esfingomiélna; y, diglucosildiacilglicéridos. En una modalidad preferida, el lípido se encuentra en abundancia en la membrana celular.

 En una modalidad específica, los lípidos utilizados para formar los

20 liposomas se seleccionan conforme a su disponibilidad en la membrana celular, utilizándose preferiblemente un lípido cilíndrico en combinación con un lípido cónico en una relación molar entre 1:1 y 4:1. En una modalidad adicional, se utiliza una combinación de fosfatidilcolina con fosfatidato de yema de huevo en una relación molar 2: 1.

25 En otra modalidad adicional, además el suero del sujeto, se hace

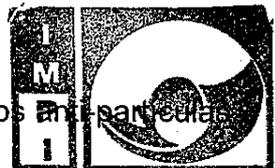


reaccionar con el antígeno por lo menos con un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas para confirmar la presencia o no de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en el suero del sujeto.

En otra modalidad preferida, la detección se realiza de manera directa haciendo reaccionar células del sujeto con por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas, preferiblemente mediante el uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

En una modalidad adicional, además de las células del sujeto, se hace reaccionar con el anticuerpo al mismo tiempo por lo menos un antígeno que contenga partículas lipídicas, preferiblemente seleccionado entre células neoplásicas y liposomas de por lo menos un lípido susceptible de cambio de geometría por medio de cambios de temperatura, presencia de iones divalentes y/o presencia de fármacos, dicho lípido siendo preferiblemente seleccionado entre fosfatidato; cardiolipina; fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol; fosfatidilcolina; fosfatidilserina; esfingomielina; y, diglucosildiacylglicéridos.

Para obtener los liposomas que se utilizan en varias modalidades de la presente invención, se utiliza preferiblemente el método de evaporación de fase reversible descrito por Baeza y col. (op. cit.) y posteriormente se les trata con un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente seleccionado entre cationes divalentes, fármacos y combinaciones de los mismos, en donde el tratamiento para formar partículas lipídicas se realiza preferiblemente mediante incubación de los liposomas con una cantidad efectiva del agente formador de partículas lipídicas a una temperatura de 25 a 40°C, dicha cantidad efectiva siendo preferiblemente una relación molar lípidos: agente formador de partículas lipídicas desde 1:50 hasta 1:1000.



En cuanto a los métodos de detección de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de pacientes mediante el uso de antígenos que contienen partículas lipídicas, o bien, de detección de partículas lipídicas en células de pacientes mediante el uso de anticuerpos anti-partículas lipídicas, a continuación se describirán las técnicas preferidas para tales detecciones.

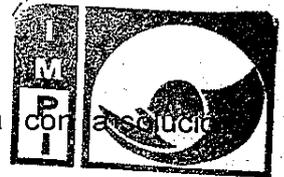
Por una parte, el método de ELISA-liposomal, comprende las siguientes etapas:

A) Una primera etapa de adición, e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de una suspensión del antígeno a cada uno de los pozos de una inmunoplaaca de ELISA de alta propiedad de unión a antígenos y dicha inmunoplaaca se incuba a temperatura ambiente durante 0.5 a 1.5 h.

B) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de una solución de bloqueo a cada uno de los 10 pozos de una inmunoplaaca de ELISA de alta propiedad de unión a antígenos y dicha inmunoplaaca se incuba a temperatura ambiente durante 0.5 a 1.5 h.

C) Una etapa de eliminación de la solución de bloqueo, preferiblemente por succión.

D) Una tercera etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva del portador del anticuerpo a cada uno de los pozos de la inmunoplaaca de ELISA en una dilución portador:solución de bloqueo desde 1:5 hasta 1:75, dicha inmunoplaaca incubándose durante 0.5 a 1.5 h a una temperatura entre 35 y 40°C.



Instituto
Mexicano
de Seguridad
Industrial

E) Una primera etapa de lavado de la inmunoplaca de bloqueo, preferiblemente repitiéndose 4 veces.

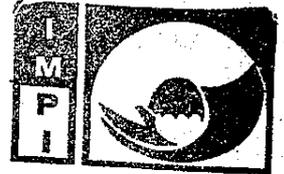
5 F) Una cuarta etapa de adición e incubación, en la que se agrega a cada uno de los pozos de la inmunoplaca de ELISA una cantidad efectiva de un anticuerpo seleccionado preferiblemente entre anticuerpos de cabra anti-IgG, IgA e IgM o anti Fc de IgM de ratón, conjugado a peroxidasa, en una dilución final entre 1:25 y 1:2000, dicha inmunoplaca incubándose en la oscuridad durante 0.5 a 1.5 horas a una temperatura entre 35 y 40°C.

10 G) Una cuarta etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva del substrato de la peroxidasa a cada uno de los pozos de la inmunoplaca de ELISA y dicha placa se incuba durante 0.1 a 0.5 horas a una temperatura entre 35 y 40°C, deteniéndose la reacción de la peroxidasa por medio de una
15 cantidad efectiva de ácido sulfúrico.

H) Una etapa de análisis de las placas en un equipo de lectura de ELISA, preferiblemente a 492 nm.

En una modalidad específica, la suspensión del antígeno se obtiene suspendiendo al antígeno en una solución reguladora de pH, a pH 7, en una
20 relación desde 0.001 hasta 0.05 moles de antígeno por litro de solución reguladora de pH.

Asimismo, la solución de bloqueo, comprende un regulador de pH, pH 7, y un 4% peso en volumen de una solución con alto contenido de proteínas, preferiblemente gelatina, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de
25 partículas lipídicas, preferiblemente con la cantidad efectiva y el agente formador



de partículas lipídicas utilizados para formar el antígeno.

En una modalidad preferida, la cantidad efectiva de la suspensión antígeno en la etapa A) es desde 50 hasta 100 μ l.

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

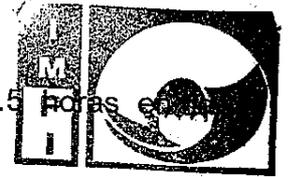
Por otra parte, el método de citofluorometría liposomal (Baeza y col., op. cit.), como su nombre lo indica, es aplicable en aquellos casos en que el antígeno es un liposoma, independientemente del origen del portador del anticuerpo, y comprende las siguientes etapas:

10 A) Una primera etapa de adición e incubación, en la que se agrega el portador del anticuerpo a una suspensión del antígeno, dicho portador estando a una dilución desde 1:5 hasta 1:75, incubándose la mezcla obtenida durante 0.5 a 1.5 h a una temperatura entre 35 y 40°C.

15 B) Una primera etapa de lavado del antígeno con una solución reguladora de pH, pH 7, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente con la cantidad efectiva y el agente formador utilizados para obtener el antígeno.

C) Una etapa de recuperación del antígeno, preferiblemente por centrifugación.

20 D) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega al antígeno centrifugado una cantidad efectiva de un anticuerpo preferiblemente seleccionado entre anticuerpos de cabra anti-IgG, IgA e IgM o anti Fc de IgM de ratón conjugado a una sustancia o substrato fluorescente, preferiblemente isotiocianato de fluoresceína
25 (FITC), para tener una dilución final entre 1:25 y 1:3500,



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

incubándose la mezcla obtenida durante 0.5 a 1.5 horas en
obscuridad a una temperatura entre 35 y 40°C.

E) Una segunda etapa de lavado del antígeno con un regulador de
pH, pH 7, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de

5 partículas lipídicas, preferiblemente con la misma cantidad y el
mismo agente formador utilizados para obtener el antígeno.

F) Una etapa de suspensión y análisis, en la que el antígeno se
suspende en una solución reveladora, seleccionada preferiblemente
entre FACS Flow (Beckton Dickinson Co.) y Haema Line 2
10 (Serotono-Baker Diagnostics, 1 NC), en una relación desde 0.1
hasta 10 moles del antígeno en 1000 ml de la solución, dicha
solución siendo preferiblemente filtrada previamente con un filtro de
0.22 μm de diámetro de poro, analizándose la mezcla obtenida en
un citómetro de flujo, preferiblemente con rayo láser de argón de
15 488 nm.

En una modalidad preferida, la suspensión del antígeno se obtiene
suspendiendo el antígeno en una solución reguladora de pH, a pH 7, en una
relación de 0.5 a 5 moles por litro de solución reguladora de pH.

Por lo que se refiere a los métodos de detección de partículas no
20 lipídicas en células en estados fisiológicos particulares, el método de
inmunofluorescencia indirecta para células, aplicable cuando el antígeno es una
célula, comprende las siguientes etapas:

A) Una primera etapa de adición e incubación, en la que se coloca
una cantidad efectiva del antígeno, preferiblemente 1×10^3 células, en
25 un cubre objetos dentro de una caja de cultivo celular y se incuba en



atmósfera que contenga una cantidad efectiva de CO_2 a una temperatura entre 35 y 40°C hasta alcanzar un 90% de confluencia celular.

5 B) Una primera etapa de lavado que consiste en lavar el antígeno con un medio de cultivo adecuado, preferiblemente repitiéndose 2 veces, y con una solución reguladora de fosfatos, pH 7.4, en condiciones de esterilidad,

10 C) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega al antígeno una cantidad efectiva de un portador de anticuerpos, preferiblemente de 50 a 200 μ l sin diluir, o bien, con una dilución máxima de 1:2, incubándose en una atmósfera que contenga una cantidad efectiva de CO_2 durante 0.5 a 1.5 h a una temperatura de 35 a 40°C.

15 D) Una segunda etapa de lavado que consiste en lavar el antígeno con una solución reguladora de fosfatos, pH 7.4, por lo menos 3 veces.

20 E) Una tercera etapa de adición e incubación, en la que se agrega al antígeno una cantidad efectiva de un anticuerpo seleccionado preferiblemente entre anticuerpos de cabra anti-IgG, IgA e IgM o anti Fc de IgM de ratón, conjugado a FITC, incubándose el antígeno en una atmósfera que contenga una cantidad efectiva de CO_2 durante 0.5 a 1.5 h a una temperatura de 35 a 40°C.

25 F) Una tercera etapa de lavado que consiste en lavar el antígeno con una solución reguladora de fosfatos, pH 7.4, preferiblemente repitiéndose 3 veces.



G) Una etapa de análisis en la que el cubreobjetos se monta en un portaobjetos para observarse en un microscopio epifluorescencia y óptica de Nomarski.

En una modalidad específica, la cantidad efectiva de CO₂ es de 5% en volumen con respecto al aire, mientras que la cantidad efectiva de solución reguladora de fosfatos es de 10 ml.

Cabe señalar que en la descripción de dichas técnicas el término "portador del anticuerpo" se refiere a cualquier fluido susceptible de contener anticuerpos anti-partículas lipídicas, como puede ser un suero, una solución o una suspensión, mientras que el término "antígeno" se refiere a aquellas estructuras susceptibles de contener partículas lipídicas tales como liposomas o células.

Adicionalmente, es importante señalar que en una modalidad específica de la presente invención, antes de iniciar cualquier método de detección, se realiza una inactivación del sistema del mediante temperatura, preferiblemente sometiéndolo a temperaturas entre 50 y 60°C durante 15 a 60 minutos.

Otro de los aspectos de la presente invención es un kit o instrumento de diagnóstico in vitro de enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos útil para realizar el método de la presente invención que incluye por lo menos un reactivo indicador de la presencia de partículas lipídicas y/o anticuerpos anti-partículas lipídicas en una muestra de un sujeto que no presenta anticuerpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico, anti-ADN o antinucleares; medios para permitir la reacción de la muestra con el reactivo; y, medios para hacer evidente dicha reacción.

En una modalidad preferida, el reactivo se selecciona entre liposomas con partículas lipídicas en su superficie, células neoplásicas y anticuerpos



monoclonales anti-partículas lipídicas.

La manera preferida de aplicar la presente invención es mediante el suministro de los anticuerpos monoclonales que aquí se presentan en una composición farmacéutica que los contiene, en donde se proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva con un régimen de dosis unitaria conveniente a un individuo que padece de enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos, dicho régimen se puede ajustar de conformidad con el grado de aflicción.

La preparación de una composición farmacéutica que incluya a los anticuerpos monoclonales de la invención, se puede llevar a cabo mediante el empleo de técnicas estándares bien conocidas por los expertos en la materia en combinación con cualesquiera de los portadores farmacéuticamente aceptables descritos en el estado de la técnica, incluyendo, pero no limitando al almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina de trigo, tiza, sílica-gel, estearato de magnesio, estearato de sodio, talco de monoestearato de glicerilo, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Estas composiciones pueden tomar la forma farmacéutica de soluciones, suspensiones, tabletas, pastillas, cápsulas, polvos y formulación de liberación prolongada y los similares.

La descripción anterior y los siguientes ejemplos tienen como propósito el ilustrar modos particulares de llevar a cabo la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de protección de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención de hibridomas por fusión de células P3x63Ag8U.1 con



células de bazo de un ratón BALB/c productor de anticuerpos lipídicas.

El bazo de un ratón hembra BALB/c en cuya muestra de suero se detectaron anticuerpos anti-partículas lipídicas en una dilución 1:40, fue extraído en condiciones de esterilidad y se colocó en una caja de petri, agregándosele 6 ml de medio DMEM incompleto. Con unas pinzas de puntas romas, se disgregó hasta obtener una suspensión celular, la cual se transfirió a un tubo falcon de 15 ml y se dejó en reposo para que sedimentaran los residuos gruesos. A continuación la suspensión celular se transfirió a otro tubo falcon y centrifugó a 17 x g durante 7 min. Posteriormente se decantó y las células se resuspendieron por agitación suave y se diluyeron por la agregación gota a gota de 10 ml de medio DMEM incompleto. La preparación celular se centrifugó como ya se indicó, se decantó y se le agregaron 4 ml de NH₄Cl 0.16 M para lisar los eritrocitos. En este paso el tubo se incubó a 37°C y se rotó con suavidad durante 4 min. Posteriormente se agregaron 6 ml de medio DMEM incompleto y se centrifugó a 17 x g por 7 min, se decantó y el paquete celular se resuspendió en 10 ml de medio DMEM incompleto que se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso (Kóhier y Milstein, 1975).

Por otra parte, las células de mieloma P3x63Ag8U.1 se colectaron de las cajas de cultivo en tubos falcon y se tomaron alícuotas que fueron tratadas con el colorante azul de tripano y se contaron, al igual que las células del bazo del ratón BALB/c inmune, en una cámara de Neubauer. La viabilidad de ambos tipos celulares fue mayor al 85%. Las poblaciones celulares de P3x63Ag8U.1 y de bazo del ratón inmune se centrifugaron a 17 x g durante 5 min. Después se mezclaron en una proporción celular 1:1, con 36 x 10⁶ células de cada tipo y se lavaron con



10 ml de medio DMEM incompleto. Una vez hecho esto, se decantó, se eliminó el medio de cultivo y el paquete celular se disgregó con suavidad. Posteriormente se agregó gota a gota, durante 1 min, 1 ml de la solución de polietilenglicol 400, se agitó manualmente durante 1.5 min y se añadió en 30 seg 1 ml de medio DMEM

5 incompleto, con rotación lenta del tubo. A continuación, se agregaron 3 ml de DMEM incompleto durante 30 seg con rotación del tubo, después se agregaron 16 ml del mismo medio durante 1.5 min y con agitación suave, finalmente el volumen se llevó a 40 ml y se incubó sin agitación durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 17 x g durante 5 min. Se decantó y se lavó una

10 vez con 40 ml de medio DMEM incompleto. El paquete celular se resuspendió en 30 ml del medio de selección DMEM-HAT, se tomaron alícuotas de 100 µl de esta suspensión celular y se colocaron en los 96 pozos de cada una tres placas de cultivo celular que 24 horas antes de la fusión se habían sembrado con macrófagos. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C, en atmósfera con 5% de

15 CO₂. A los 5 y 8 días después de la fusión los híbridos se alimentaron con 50 µl de medio DMEM-HAT, a los 11 días se les cambió el medio por 100 µl de DMEM-HT.

Quando los híbridos se desarrollaron, se tomaron los sobrenadantes y se analizaron por el método de ELISA-liposomal. De todos lo híbridos que dieron resultados positivos se tomaron muestra celulares y se congelaron a -70°C en

20 nitrógeno líquido. Posteriormente se eligieron 8 híbridos que dieron la inmunorreacción de mayor intensidad y se transfirieron por duplicado a placas de cultivo celular de 24 pozos, para obtener mayor cantidad de sobrenadantes y determinar la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas por ELISA-liposomal.

25 Los hibridomas que dieron títulos más altos de anticuerpos anti-



partículas lipídicas se volvieron a clonar en placas de cultivo celular de 96 pozos. Los híbridos que se desarrollaron, se analizaron para detectar aquellos productores de anticuerpos anti-partículas lipídicas por ELISA-liposomal, y los que dieron los títulos más altos de estos anticuerpos se cultivaron en botellas de 250 ml para la obtención masiva de los sobrenadantes que contienen dichos anticuerpos.

Así mismo, los hibridomas se inocularon en ratones BALB/c para la obtención de líquido ascítico que contenga una alta concentración de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se caracterizaron en cuanto al isotipo y se purificaron por precipitación con ácido bórico para su uso en ensayos de ELISA liposomal, citofluorometría e inmunofluorescencia indirecta.

Ejemplo 2. Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales y policlonales que reconocen las asociaciones moleculares lipídicas de no bicapa mediante ELISA liposomal.

En este ensayo se analizó la especificidad de los anticuerpos monoclonales en contra de partículas lipídicas. Para ello se empleó el ensayo de ELISA empleando liposomas con lípidos definidos, los anticuerpos monoclonales y policlonales en contra de partículas lipídicas y un anticuerpo monoclonal del isotipo IgM con especificidad totalmente diferente a la de los anticuerpos monoclonales en contra de partículas lipídicas (Ortega-Pierres, y col., op cit. 1984).

El ensayo de ELISA se lleva a cabo empleando liposomas que tienen L-fosfatidilcolina y L- α ácido fosfatídico de acuerdo al método descrito para ELISA liposomal, en esta modalidad se empleó el sobrenadante de hibridomas que



contiene anticuerpos monoclonales en contra de asociaciones lipídicas sin el
una dilución 1:2, los sueros colectados de animales inmunizados con partículas
lipídicas se diluyen 1:50.

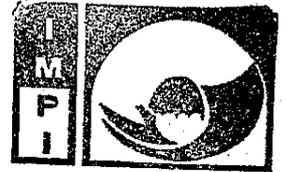
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales presentan
5 una reactividad mayor con las estructuras de no bicapa inducidas por Mn^{2+} ,
mientras que el anticuerpo policlonal se une con menor avidez y reconoce a las
estructuras de liposomas lisos. El anticuerpo monoclonal no específico no muestra
ninguna reacción con liposomas lisos o que tienen una estructura de no bicapa.
Debido a que en los ensayos de rutina para medir anticuerpos antifosfolípidos se
10 utilizan placas cubiertas con lípidos disueltos en etanol se determinó la unión del
anticuerpo monoclonal a fosfolípidos purificados como L-fosfatidilcolina, L- α ácido
fosfatídico y cardiolipina. Los resultados muestran que el anticuerpo monoclonal
no interacciona con placas cubiertas con estos lípidos mientras que el anticuerpo
policlonal si lo hace. Estos resultados sugieren de fuertemente que los anticuerpos
15 monoclonales interaccionan con superficies de lípidos no planos. Figura 2.

Ejemplo 3. Detección de anticuerpos contra lípidos en asociaciones de bicapa o
de partículas lipídicas en sueros de individuos con el síndrome de antifosfolípido
primario o secundario y sueros de control.

20 Se utilizaron como antígenos liposomas de fosfaridilcolina:fosfatidato
(2:1) en Tris-NaCl (10mM-1mM) solos o incubados con $CaCl_2$ o $MnCl_2$ 5mM
durante 30 min a 37°C.

Los sueros de los pacientes con el síndrome de antifosfolípidos primario
o secundario se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos
25 contra las partículas lipídicas. Como controles negativos se utilizaron sueros de



donadores del banco de sangre.

Se emplearon tubos de ultracentrífuga (Beckman ultra-clear, No. 344060) de 14 x 95 mm. en los cuales se colocaron liposomas a concentración de 0.1 μmol del lípido cónico en 100 μl de regulador de TS a pH 7.0; posteriormente se adicionaron sueros de los pacientes o de los donadores, que previamente fueron descomplementados a 56°C por 30min, a una dilución final de 1:80, estas preparaciones se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después de la incubación, los liposomas se lavaron con regulador de TS solo o con CaCl_2 ó MnCl_2 5 mM, y se centrifugaron 50 min a 202,000 x g. A continuación se eliminó el sobrenadante, y la pastilla de liposomas se resuspendió en 100 μl de TS pH 7.0. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG, IgA e IgM de humano conjugado a isotiocianato de fluoresceína a una dilución 180, y se incubó 1 h a 37°C en oscuridad; después de la incubación las preparaciones se lavaron como se describió anteriormente. Por último, la pastilla de liposomas se resuspendió en 1,000 μl de TS pH 7.0.

Los antígenos que se incluyeron fueron: del segundo anticuerpo conjugado a FITC y el de liposomas; a ambos se les aplicó el tratamiento descrito para la reacción de los anticuerpos de los sueros de los pacientes excepto que no se les agregó el suero, ni el segundo anticuerpo conjugado a FITC para el testigo de liposomas. Cuando se trabajó con Mn^{2+} ó Ca^{2+} , se agregaron los siguientes testigos, el testigo de conjugado con el catión divalente y el testigo de liposomas tratados con el catión divalente. Como control positivo, se empleó la reacción del anticuerpo monoclonal H-308 con los liposomas que llevan partículas lipídicas.

Las preparaciones liposomales obtenidas se colocaron en tubos para citometría de 12 x 75 mm (Elkay Products, Inc.) y se leyeron en el citofluorómetro



FACScalibur equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson Co.) se empleó el regulador de fosfatos para citometría, y se usaron los siguientes parámetros en el citofluorómetro: FSC-H E00, SSC-H A 401 V. FL1-H a 748 V, un threshold de FSC-H en 52. Finalmente se hizo el análisis de los datos obtenidos con el programa de Cellsquest (Beckton Dickinson).

Los resultados del análisis de la inmunoreacción de los sueros de los pacientes con lupus eritomatoso generalizado (LGE), con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) o con SAAF secundario a LGE empleando liposomas tratados con calcio mostró una fluorescencia 20 a 40 veces mayor que la reacción de los sueros control con esos antígenos liposomales. Los sueros de donadores del banco de sangre no presentaron reacción con las partículas lipídicas ya que los resultados de fluorescencia obtenidos fueron semejante a los de autofluorescencia de liposomas control incubados en Tris NaCl y tratados con calcio.

15

Ejemplo 4. Detección de partículas lipídicas en células eucarionticas.

La detección de partículas en células neoplásicas C5337 provenientes de cáncer de páncreas se llevó a cabo por el método de inmunofluorescencia indirecta.

20

En una caja de cultivo celular P60 se colocó un cubreobjetos esteril por cada ensayo que se realizó; se agregaron aproximadamente 1×10^6 células de la línea celular de cáncer de páncreas las cuales se dejaron adherir y crecer.

Cuando se obtuvo aproximadamente 90% de confluencia celular en los cubreobjetos, las células se lavaron 2 veces con medio DMEM incompleto y una vez con dos ml de regulador de fosfatos de pH 7.4 estéril. Posteriormente las

25



células se fijaron con 1 ml de solución de glutaraldehído 0.2%-formaldehído 0.2% durante 5 min. y se lavaron 3 veces con dos ml de regulador de fosfatos. A continuación se agregaron 200 ml. de los sobrenadantes del hibridoma H308 sin diluir y se incubó 1 hr a 37°C. Posteriormente los cultivos se lavaron 3 veces con 2 ml de regulador de fosfatos y se les agregó 200 µl de una dilución 1:100 del anticuerpo anti-Fc de IgM de ratón conjugado con FITC. Estas preparaciones se incubaron 1 h a 37°C después se lavaron 3 veces con regulador de fosfatos. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con regulador de fosfatos, se sellaron con barniz transparente y se observaron en microscopio de epifluorescencia y óptica de Nomarski (Nikon optiphot-2) con objetivos 20X y 40X. Los resultados mostraron que las células neoplásicas se marcan básicamente de dos maneras: (1) células en las cuales se observaron zonas con una fuerte intensidad de fluorescencia localizada en pequeños puntos. En algunos casos se encontró que los puntos de fluorescencia correspondían a las posibles zonas de unión entre las células. Así mismo se observaron células que se marcaron en toda la superficie. En estos casos la célula presentaba una morfología redonda la cual corresponde a células no adheridas a la placa de cultivo indicando que estas células estaban muertas o en apoptosis, o no adheridas a otras células debido al proceso de división celular. La intensidad de la fluorescencia fue mayor encima del núcleo pero se localizó prácticamente en toda la superficie celular (Figura 3), los controles que se incluyeron en este análisis fueron células que se incubaron únicamente con el segundo anticuerpo mostrando una fluorescencia muy tenue que puede corresponder a la unión inespecífica del anticuerpo.

De conformidad con lo anteriormente descrito, se podrá observar que el uso de los anticuerpos obtenidos a partir de estructuras lipídicas diferentes a la



bicapa para determinar estados fisiológicos celulares y para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades han sido ideado para permitir una detección temprana de enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos, y será evidente para cualquier experto en la materia que las modalidades que aquí se presentan, son únicamente ilustrativas más no limitativas de la presente invención, ya que son posibles numerosos cambios de consideración en sus detalles sin apartarse del alcance de la invención.

Aún cuando se ha ilustrado y descrito una modalidad específica de la invención, debe hacerse hincapié en que son posibles numerosas modificaciones a la misma, como pueden ser el uso de diferentes cepas de ratones, lípidos para obtener los liposomas, métodos de inmunización y métodos de obtención de hibridomas, diversos reactivos para el instrumento de diagnóstico y/o diversas enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos. Por lo tanto, la presente invención no deberá considerarse como restringida excepto por lo que exija la técnica anterior y por el espíritu de las reivindicaciones anexas.



Reivindicaciones.

1. Una línea celular de hibridoma depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes del Instituto Pasteur (CNCM) con el número de acceso I-2537.
2. Un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma de conformidad con la reivindicación 1, el cual reconoce específicamente estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares y no presenta inmunorreacción contra fosfolípidos purificados seleccionados del grupo que consiste de L- α -ácido fosfatídico, L- α -fosfatidilcolina y cardiolipina.
3. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 como ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un método de obtención de la línea celular de hibridoma de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende las etapas de:
 - a) Fusionar células murinas de bazo sensibilizadas con liposomas que contienen estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares, con células de mieloma de ratón P3X63 Ag8U.1 para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y
 - b) Seleccionar aquellos hibridomas obtenidos en a) que produzcan anticuerpos que reconozcan liposomas que contienen estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares y que no presenten inmunorreacción contra fosfolípidos purificados seleccionados del grupo que consiste de L- α -ácido fosfatídico, L- α -fosfatidilcolina y cardiolipina.



5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque los liposomas utilizados en el paso a), son liposomas de fosfatidil:fosfatidato en una proporción p/p 2:1 y tratados previamente con Mn^{2+} .
6. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque las células murinas de bazo y de mieloma de ratón son viables al menos en un 85% y se mezclan en una proporción celular de 1:1.
7. Un método de obtención del anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende las etapas de:
- Expandir la línea celular de hibridoma de conformidad con la reivindicación 1 en condiciones tales que permitan la producción de anticuerpos, y
 - Purificar los anticuerpos monoclonales obtenidos en a).
8. Un método de inmunodiagnóstico para detectar en un individuo el desarrollo temprano de una enfermedad relacionada con la presencia de estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares y la no presencia de anticuerpos anti-cardiolipina, anti-coagulante lúpico, anti-ADN o anti-nucleares, caracterizado porque comprende las etapas de:
- Mezclar una muestra biológica del individuo, sospechosa de contener estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares, con el anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2,
 - Añadir a la mezcla obtenida en a) un reactivo detectable marcado útil para detectar la unión del anticuerpo monoclonal a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares contenidas en la muestra del individuo, y



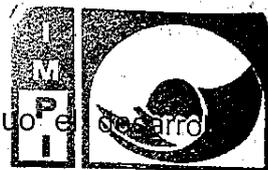
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

- c) Detectar la presencia del anticuerpo monoclonal unido a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares.
9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el reactivo detectable marcado comprende un anticuerpo polivalente anti-humano unido a un componente seleccionado del grupo que consiste de enzimas y fluorocromos, el cual se une al anticuerpo monoclonal.
10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el anticuerpo polivalente anti-humano marcado comprende al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de anticuerpos IgG, IgM e IgA.
11. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque se realiza mediante un método seleccionado del grupo que comprende ELISA, citofluorometría, inmunofluorescencia, Western blot, radioinmunoensayo e inmunoprecipitación.
12. Un método de inmunodiagnóstico para detectar en un individuo el desarrollo temprano de una enfermedad relacionada con la presencia de estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares y la no presencia de anticuerpos anti-cardiolipina, anti-coagulante lúpico, anti-ADN o anti-nucleares, caracterizado porque comprende las etapas de:
- a) Mezclar una muestra biológica del individuo, sospechosa de contener estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares, con el anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 unido a un componente seleccionado del grupo que consiste de enzimas y fluorocromos, y
- b) Detectar la presencia del anticuerpo monoclonal unido a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque comprende un método seleccionado del grupo que comprende ELISA, citofluorometría, inmunofluorescencia, Western blot, radioinmunoensayo o inmunoprecipitación.
14. Un estuche de inmunodiagnóstico para detectar en un individuo el desarrollo temprano de una enfermedad relacionada con la presencia de estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares y la no presencia de anticuerpos anti-cardiolipina, anti-coagulante lúpico, anti-ADN o anti-nucleares, mediante la detección directa de dichas estructuras, caracterizado porque comprende:
- a) El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2,
 - b) Un reactivo detectable marcado útil para detectar la unión del anticuerpo monoclonal a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares contenidas en la muestra biológica del individuo, y
 - c) Una solución buffer como un medio para permitir las condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo monoclonal a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares contenidas en la muestra biológica del individuo.
15. El estuche de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el reactivo detectable marcado comprende un anticuerpo polivalente anti-humano unido a un componente seleccionado del grupo que consiste de enzimas y fluorocromos, el cual se une al anticuerpo monoclonal.
16. El estuche de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo polivalente anti-humano marcado comprende al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de anticuerpos IgG, IgM e IgA.



17. Un estuche de inmunodiagnóstico para detectar en un individuo temprano de una enfermedad relacionada con la presencia de estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares y la no presencia de anticuerpos anti-cardiolipina, anti-coagulante lúpico, anti-ADN o anti-nucleares, mediante la detección directa de dichas estructuras, caracterizado porque comprende:
- a) El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 unido a un componente seleccionado del grupo que consiste de enzimas y fluorocromos, y
 - b) Una solución buffer como un medio para permitir las condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo monoclonal a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares contenidas en la muestra biológica del individuo.
18. El uso del anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación no. 2 para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la presencia de anticuerpos que reconocen estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares.
19. El uso de conformidad con la reivindicación 18 donde las enfermedades relacionadas se seleccionan del grupo que comprende síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SAAF) primario o secundario, vasculitis, artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado (LEG), neoplasias del tipo del carcinoma en el hígado u ovario, linfomas, leucemias, desórdenes mieloproliferativos, mononucleosis infecciosa, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, sífilis, malaria e infarto al miocardio.
20. El uso del anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación no. 2 como control positivo en un método de diagnóstico que permita la detección de

anticuerpos anti-estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares en muestras biológicas de animales que presentan enfermedades relacionadas con la presencia de dichos anticuerpos.



**Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial**

- 5
21. El uso de conformidad con la reivindicación 20 donde el método de diagnóstico se selecciona del grupo que comprende ELISA, citofluorometría, inmunofluorescencia, Western blot, radioinmunoensayo e inmunoprecipitación.
22. El uso de conformidad con la reivindicación 20 donde la detección de anticuerpos anti-estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares, se realiza en etapas tempranas de la enfermedad.
- 10
23. Un método de detección específica de estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares de células eucariontes, caracterizado porque comprende las etapas de:
- 15
- a) Mezclar una muestra de membranas de células eucariontes con el anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2,
 - b) Añadir a la mezcla obtenida en a) un reactivo detectable marcado útil para detectar la unión del anticuerpo monoclonal a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares contenidas en la muestra, y
 - c) Detectar la presencia del anticuerpo monoclonal unido a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares.
- 20
24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el reactivo detectable marcado comprende un anticuerpo polivalente anti-humano unido a un componente seleccionado del grupo que consiste de enzimas y fluorocromos, el cual se une al anticuerpo monoclonal.



25. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el anticuerpo polivalente anti-humano marcado comprende al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de anticuerpos IgG, IgM e IgA.

26. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque se realiza mediante un método seleccionado del grupo que comprende ELISA, citofluorometría, inmunofluorescencia, Western blot, radioinmunoensayo e inmunoprecipitación.

27. Un método de detección específica de estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares de células eucariontes, caracterizado porque comprende las etapas de:

a) Mezclar una muestra de membranas de células eucariontes con el anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 unido a un componente seleccionado del grupo que consiste de enzimas y fluorocromos, y

b) Detectar la presencia del anticuerpo monoclonal unido a las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa en membranas celulares.

28. El método de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque se realiza mediante un método seleccionado del grupo que comprende ELISA, citofluorometría, inmunofluorescencia, Western blot, radioinmunoensayo e inmunoprecipitación.

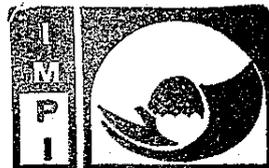
29. Un método para la purificación del anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 a partir de líquido de ascitis, caracterizado porque comprende las etapas de:

a) Agregar ácido bórico al líquido de ascitis y enfriar la mezcla resultante hasta la aparición de un precipitado,



**Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial**

- b) Separar el precipitado resultante de a) y resuspenderlo en un volumen mínimo de solución fisiológica, y
- c) Eliminar el contenido de ácido bórico de la mezcla resultante, en b)
30. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el ácido bórico se adiciona en una concentración p/p del 2%.
31. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el ácido bórico y el líquido de ascitis se mezclan en una proporción v/v 10:1 correspondientemente.
32. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque en la etapa a) la mezcla se enfría por lo menos a 4°C.
33. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque la solución fisiológica es solución salina de fosfatos.
34. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque en la etapa b) el precipitado se separa mediante centrifugación a 45,000 X g por 20 min a 4°C.
35. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque en la etapa c) el ácido bórico se elimina mediante diálisis exhaustiva con solución salina de fosfatos.



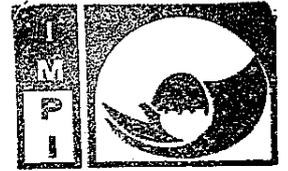
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Resumen

La presente invención está relacionada con la obtención de hibridomas murinos que producen anticuerpos monoclonales contra partículas lipídicas de no bicapa, también conocidas como partículas lipídicas en liposomas. Los anticuerpos monoclonales fueron obtenidos por la fusión de células de bazo de ratones BALB/c que fueron inmunizadas con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) unilamelares que llevan partículas lipídicas inducidas por Mn^{+2} y células de mieloma de la línea P3X63 Ag8U.1. Así mismo, en la presente invención se ha probado el uso de dichos anticuerpos en ensayos de ELISA para detectar asociaciones lipídicas de no bicapa, tanto en células animales como de plantas, de aquí su potencial uso en la prevención y tratamiento de enfermedades que cursan con la producción de anticuerpos anti-fosfolipídicos.

15

20



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

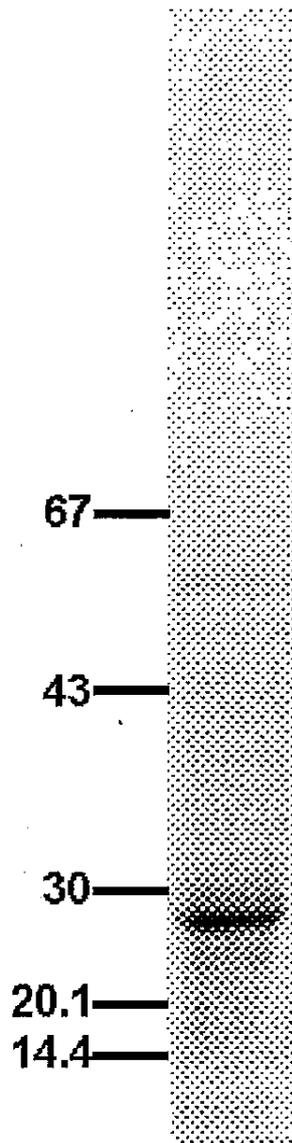
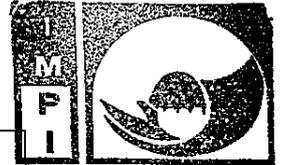
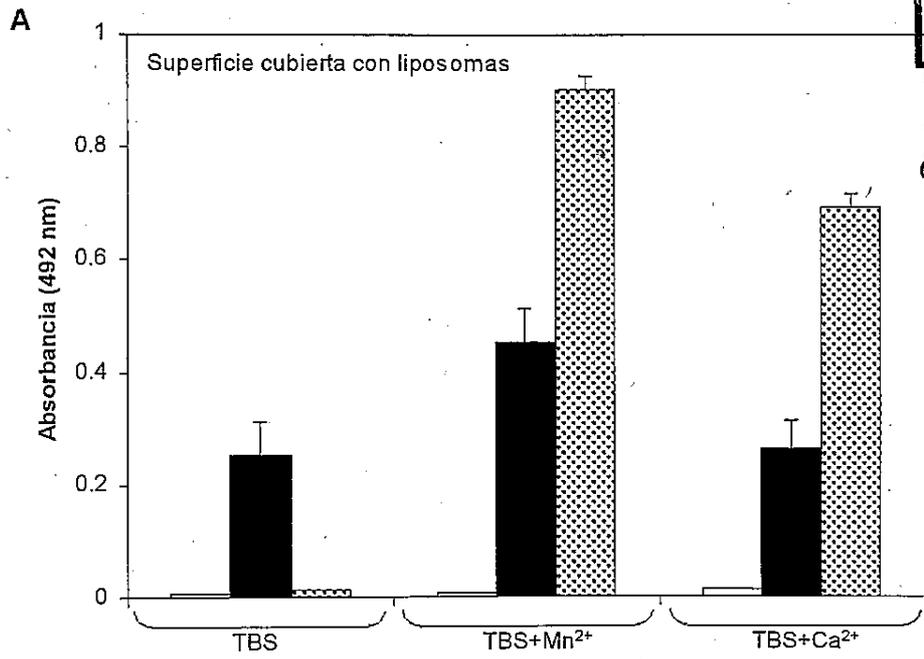


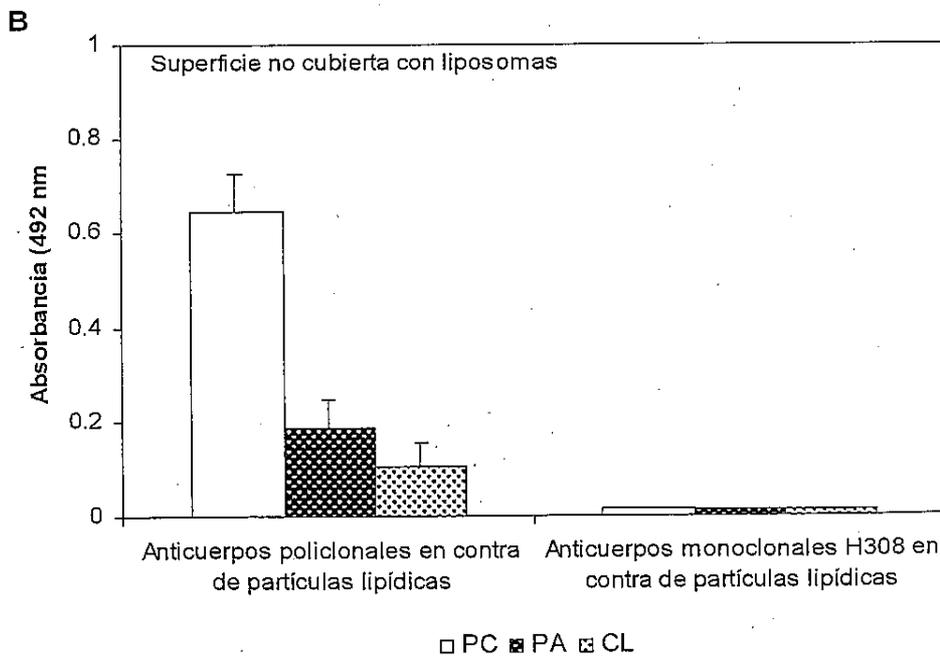
FIGURA 1



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

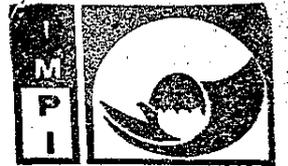


□ Anticuerpo monoclonal en contra de antígenos de superficie de L1 de *T. spiralis*
■ Anticuerpo policlonal en contra de partículas lipídicas
▨ Anticuerpo monoclonal H308 en contra de partículas lipídicas



□ PC ■ PA ▨ CL

FIGURA 2



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

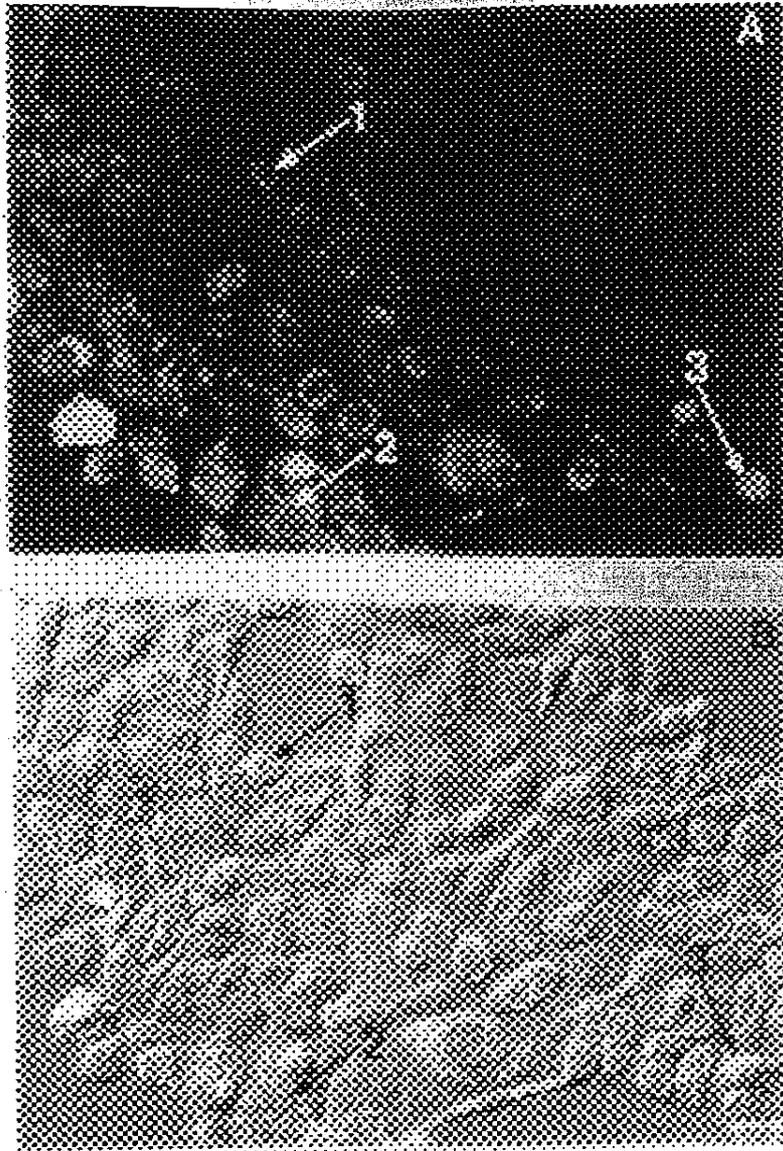


FIGURA 3