(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 654 578**

(51) Int. CI.:

C07F 9/10 (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)
A61K 31/685 (2006.01)
A61K 31/7032 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2005 PCT/NZ2005/000052**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2005 WO05090368**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2005 E 05722123 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 1735323**

(54) Título: **Anclajes de membrana sintética**

(30) Prioridad:

22.03.2004 NZ 53186604
28.01.2005 NZ 53794105

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2018

(73) Titular/es:

KODE BIOTECH LIMITED (100.0%)
SCOTT LABORATORY BUILDING AUCKLAND UNIVERSITY OF TECHNOLOGY 19 MOUNT STREET
AUCKLAND, NZ

(72) Inventor/es:

BOVIN, NICOLAI;
GILLIVER, LISSA;
HENRY, STEPHEN y
KORCHAGINA, ELENA

(74) Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anclajes de membrana sintética

Campo de la invención

La invención se refiere a moléculas sintéticas que se incorporan espontáneamente y establemente en bicapas lipídicas, que incluyen membranas celulares. Particularmente, aunque no exclusivamente, la invención se refiere al uso de estas moléculas como anclajes de membrana sintética o construcciones de molécula sintética para efectuar cambios cualitativos y cuantitativos en la expresión de antígenos de superficie celular.

Antecedentes

Los antígenos de superficie celular median en una variedad de interacciones entre células y su entorno. Estas interacciones incluyen interacciones célula-célula, interacciones célula-superficie e interacciones célula-soluto. Los antígenos de superficie celular también median en la señalización intracelular.

Las células se caracterizan por diferencias cualitativas y cuantitativas en los antígenos de superficie celular expresados. Los cambios cualitativos y cuantitativos en los antígenos de superficie celular expresados alteran tanto la función celular (modo de acción) como la funcionalidad celular (acción servida).

El ser capaces de efectuar cambios cualitativos y/o cuantitativos en los antígenos de superficie expresados por una célula tiene valor diagnóstico y terapéutico. Se conocen métodos transgénicos y no transgénicos de efectuar cambios cualitativos y/o cuantitativos en los antígenos de superficie expresados por una célula.

La pintura de proteína es un método no transgénico para efectuar cambios cualitativos y/o cuantitativos en los antígenos de superficie expresados por una célula. El método explota la capacidad de proteínas unidas a GPI para anclarse espontáneamente a la membrana celular mediante sus colas lipídicas. El método descrito en la memoria descriptiva que acompaña a la solicitud internacional N.º PCT/US98/15124 (WO 99/05255) incluye la etapa de insertar una proteína unida a GPI aislada de una fuente biológica en una membrana. Se establece que proteínas ancladas a GPI aisladas tienen una capacidad poco usual de reintegrarse con una membrana de superficie celular.

Las células existen en un entorno acuoso. La membrana celular es una bicapa lipídica que sirve de barrera semipermeable entre el citoplasma de la célula y este entorno acuoso. La localización de antígenos a la superficie celular también puede lograrse usando glucolípidos como anclajes de membrana.

El método descrito en la memoria descriptiva que acompaña a la solicitud internacional N.º PCT/NZ02/00214 (WO 03/034074) incluye la etapa de insertar una cantidad controlada de glucolípido en una membrana. La cantidad de glucolípido insertada está controlada para proporcionar células con un nivel deseado de expresión de antígeno.

El método descrito en la memoria descriptiva que acompaña a la solicitud internacional N.º PCT/NZ03/00059 (WO 03/087346) incluye la etapa de insertar un glucolípido modificado en una membrana como "anclaje de membrana". El glucolípido modificado proporciona la localización de antígenos a la superficie de la célula o estructura multicelular. Así pueden conferirse nuevas características a la célula o estructura multicelular.

Estos métodos normalmente incluyen el aislamiento de un glucolípido o antígeno unido a glucolípido de una fuente biológica. El aislamiento de glucolípidos o antígenos unidos a glucolípido de fuentes biológicas es caro, variable y cantidades aislables están frecuentemente limitadas. La obtención de reactivos de fuentes zoológicas para uso terapéutico es particularmente problemática, especialmente donde el reactivo o sus productos derivados van a administrarse a un sujeto humano.

Se prefieren moléculas sintéticas para las que puede excluirse el riesgo de contaminación con agentes zoopatógenos. Se ha informado de homólogos sintéticos para glucolípidos que existen de forma natural y neoglucolípidos sintéticos. Sin embargo, para que un glucolípido sintético sea de uso como anclaje de membrana, debe ser capaz de incorporarse espontáneamente y establemente en una bicapa lipídica de un entorno acuoso. La utilidad de glucolípidos sintéticos en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas está además limitada para aquellos glucolípidos sintéticos que formarán una solución en solución salina.

Disolventes orgánicos y/o detergentes usados para facilitar la solubilización de glucolípidos en solución salina deben ser biocompatibles. Disolventes y detergentes deben ser frecuentemente excluidos o eliminados rápidamente ya que pueden ser perjudiciales para algunas membranas celulares. La eliminación de disolventes o detergentes de tales preparaciones pueden ser problemática.

Debe evitarse el daño a las membranas celulares, especialmente donde el suministro de células o estructuras multicelulares esté limitado, por ejemplo, embriones, o las células sean particularmente sensibles a perturbación, por ejemplo hepatocitos.

Existe una necesidad de moléculas sintéticas solubles en agua que sean funcionalmente equivalentes a los glucolípidos que existen de forma natural y antígenos asociados a glucolípidos con respecto a su capacidad para incorporarse espontáneamente y establemente en bicapas lipídicas, que incluyen membranas celulares.

El proporcionar tales moléculas sintéticas obviarían las limitaciones de glucolípidos y antígenos unidos a glucolípidos aislados de fuentes biológicas y facilitaría el que fueran capaces de efectuar cambios cualitativos y/o cuantitativos en los antígenos de superficie expresados por una célula.

Es un objeto de la presente invención proporcionar tales moléculas sintéticas y un método para su preparación. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar moléculas sintéticas para su uso en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Los objetos precedentes deben leerse disyuntivamente con el objeto de al menos proporcionar al público una elección útil.

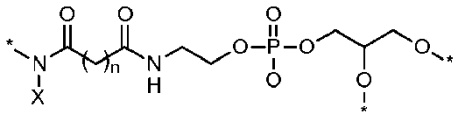
Declaraciones de la invención

En un **primer** aspecto la invención consiste en un anclaje de membrana sintética o construcción de molécula sintética de la estructura F-S_1-S_2-L donde:

F está seleccionado del grupo que consiste en hidratos de carbono;
S_1-S_2 es un espaciador que une F con L; y
L es un lípido seleccionado del grupo que consiste en diacil- y dialquil-glicerolípidos, que incluyen glicerofosfolípidos, y diacil- y dialquil-lípidos derivados de esfingosina, que incluyen ceramida.

Preferentemente, L es un lípido seleccionado del grupo que consiste en diacil- y dialquil-glicerolípidos, que incluyen glicerofosfolípidos. Más preferentemente, L está seleccionado del grupo que consiste en: diacilglicerolípidos, fosfatidato, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, fosfatidil glicerol y difosfatidil glicerol derivados de uno o más de ácido *trans*-3-hexadecenoico, ácido *cis*-5-hexadecenoico, ácido *cis*-7-hexadecenoico, ácido *cis*-9-hexadecenoico, ácido cis-6-octadecenoico, ácido *cis*-9-octadecenoico, ácido *trans*-9-octadecenoico, ácido *trans*-11-octadecenoico, ácido *cis*-11-octadecenoico, ácido *cis*-11-eicosenoico o ácido *cis*-13-docsenoico. Más preferentemente, el lípido deriva de uno o más ácidos grasos *cis*-desaturados. Lo más preferentemente, L está seleccionado del grupo que consiste en: 1,2-O-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-O-diestearil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DSPE) y rac-1,2-dioleoilglicerol (DOG).

Preferentemente, L es un glicerofosfolípido y la molécula incluye la subestructura:



donde n = 3 a 5, X es H o C, y * es distinto de H. Preferentemente, n es 3.

Preferentemente, la molécula es soluble en agua.

Preferentemente, la molécula se incorpora espontáneamente en una bicapa lipídica cuando una solución de la molécula se pone en contacto con la bicapa lipídica. Más preferentemente, la molécula se incorpora establemente en la bicapa lipídica.

Preferentemente, F, S_1, S_2 y L están covalentemente unidos.

Preferentemente, F está seleccionado del grupo que consiste en glucotopes que existen de forma natural o sintéticos.

S_1-S_2 está seleccionado para proporcionar un anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética.

En una primera realización, F es un glucotope que existe de forma natural o sintético. Preferentemente, F es un glucotope que existe de forma natural o sintético que consiste en tres (trisacárido) o más unidades de azúcar. Más preferentemente, F es un glucotope seleccionado del grupo que consiste en las series lacto-neo-tetraosilo, lactotetraosilo, lacto-nor-hexaosilo, lacto-iso-octaosilo, globoteraosilo, globo-neo-tetraosilo, globopentaosilo, gangliotetraosilo, gangliotriaosilo, gangliopentaosilo, isoglobotriaosilo, isoglobotetraosilo, mucotriaosilo y mucotetraosilo de oligosacáridos. Lo más preferentemente, F está seleccionado del grupo de glucotopes que comprende los azúcares terminales GalNAcαl-3(Fucα1-2)Galβ; Galα1-3Galβ; Galβ; Galα1-3(Fucα1-2)Galβ; NeuAcα2-3Galβ; NeuAcα2-6Galβ; Fucα1-2Galβ; Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβA1-3)Galβ; Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβα; Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6(NeuAca2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(NeuAca2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Galα1-4Galβ1-4Glc; GalNAcβ1-

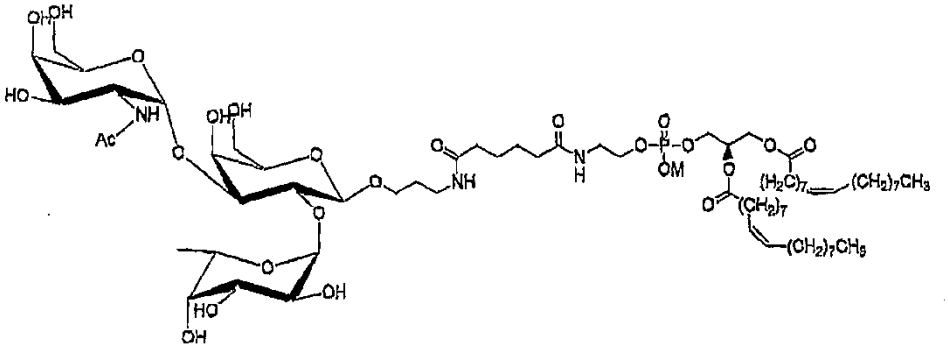
3Galα1-4Galβ1-4Glc; GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galα1-4Glc; o GalNAcβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc.

Cuando F es un glucotope, L es un glicerofosfolípido y S_2 está seleccionado del grupo que incluye: $-CO(CH_2)_3CO-$, $-CO(CH_2)_4CO-$ (adipato), $-CO(CH_2)_5CO-$ y $-CO(CH_2)_5NHCO(CH_2)_5CO-$, preferentemente S_1 es un aminoalquilo C_{3-5} seleccionado del grupo que consiste en: 3-aminopropilo, 4-aminobutilo o 5-aminopentilo. Más preferentemente, S_1 es 3-aminopropilo.

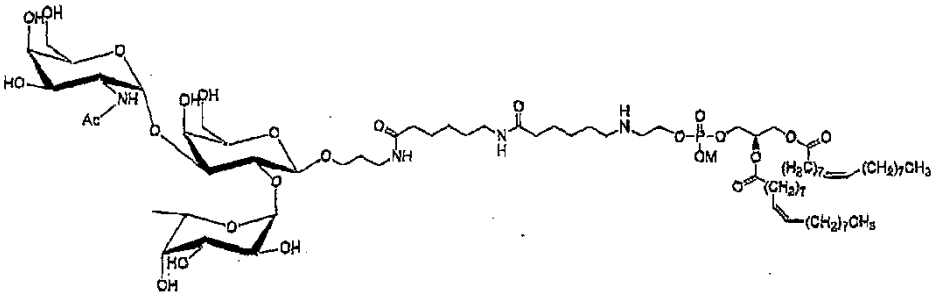
En una segunda realización, F es una molécula que media en una interacción célula-célula o célula-superficie. Preferentemente, F es un hidrato de carbono con una afinidad por un componente expresado sobre una célula o superficie dirigida. Más preferentemente, F tiene una afinidad por un componente expresado sobre células epiteliales o matrices extracelulares. Aún más preferentemente, F tiene una afinidad por un componente expresado sobre las células epiteliales o la matriz extracelular del endometrio. Lo más preferentemente, el componente expresado sobre las células epiteliales o la matriz extracelular del endometrio puede ser un componente naturalmente expresado o un componente exógenamente incorporado.

En una tercera realización, F es una molécula que media en una interacción célula-soluto. Preferentemente, F es un ligando para una molécula de unión donde la presencia de la molécula de unión es diagnóstico de una afección patológica. Más preferentemente, F es un ligando para un anticuerpo (inmunoglobulina).

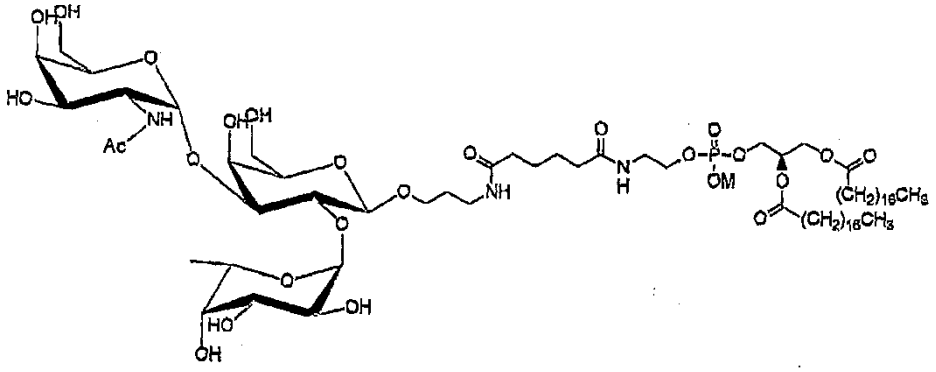
En realizaciones específicas, el anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética tiene la estructura:



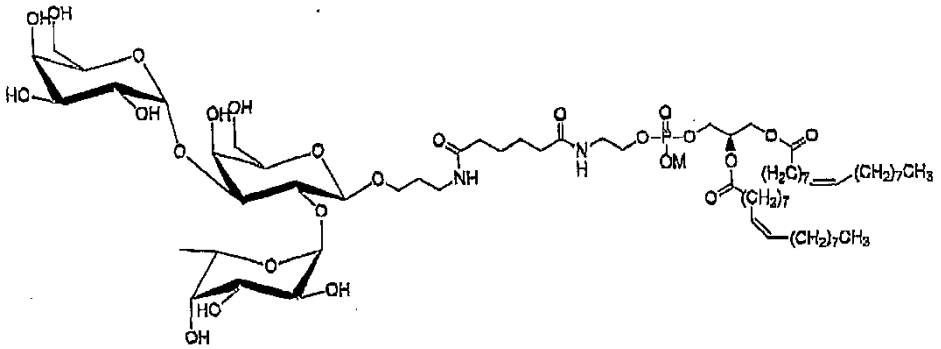
designada A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I); la estructura:



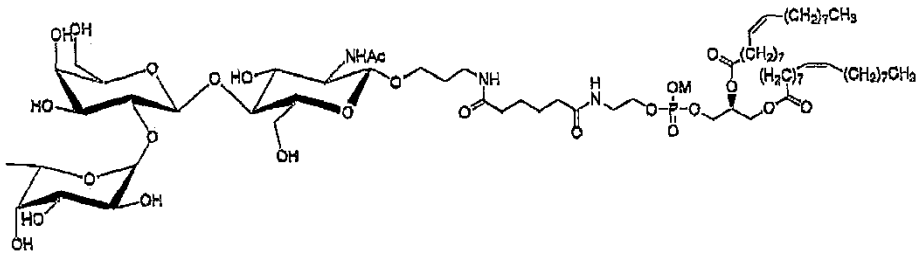
designada A_{tri}-spsp_1-Ad-DOPE (II); la estructura:



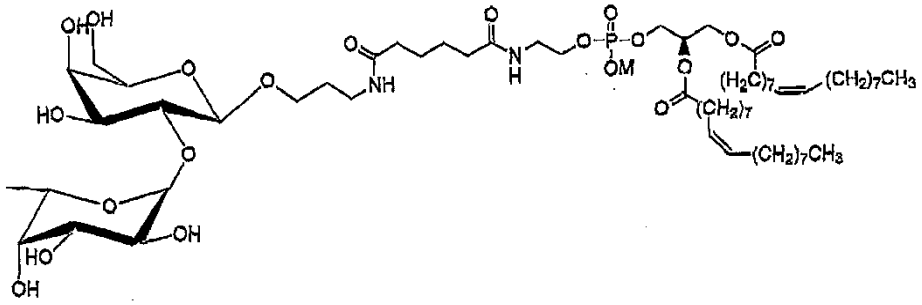
designada A_{tri}-sp-Ad-DSPE (III); la estructura



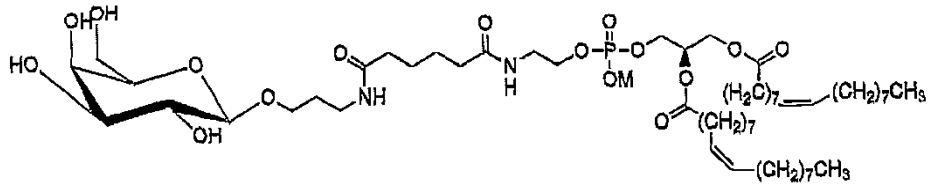
designada B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI); la estructura:



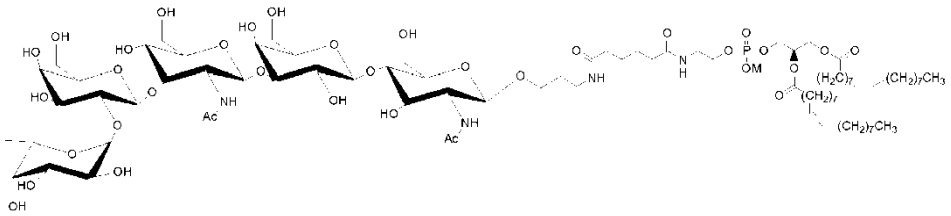
designada H_{tri}-sp-Ad-DOPE (VII); la estructura:



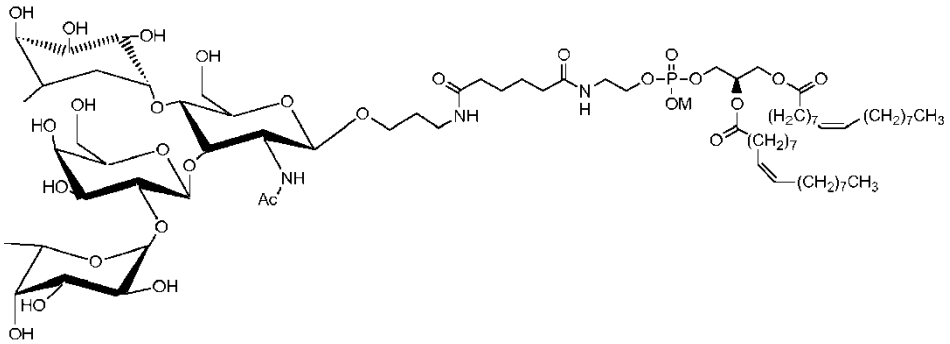
designada H_{di}-sp-Ad-DOPE (VIII); la estructura:



designada Galβ_i-sp-Ad-DOPE (IX); la estructura:



designada Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (XII); o la estructura:



designada Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (XIII).

M normalmente es H, pero puede estar sustituido por otro catión monovalente tal como Na^+, K^+ o NH_4^+.

En un segundo aspecto, la divulgación consiste en un método de preparación de un anclaje de membrana sintética o construcción de molécula sintética de la estructura F-S_1-S_2-L que incluye las etapas:

1. Hacer reaccionar un activador (A) con un lípido (L) para proporcionar un lípido activado (A-L);
2. Derivatizar un antígeno (F) para proporcionar un antígeno derivatizado (F-S_1); y
3. Condensar A-L con F-S_1 para proporcionar la molécula;

donde:

A es un activador seleccionado del grupo que incluye: ésteres de *bis*(N-hidroxisuccinimidilo), *bis*(4-nitrofenilo), bis(pentafluorofenilo), *bis*(pentaclorofenilo) de ácidos carbodioicos (C_3 a C_7);
L es un lípido seleccionado del grupo que consiste en diacil- y dialquil-glicerolípidos, que incluyen glicerofosfolípidos, y diacil- y dialquil-lípidos derivados de esfingosina, que incluyen ceramida. F está seleccionado del grupo que consiste en hidratos de carbono; y
S_1-S_2 es un espaciador que une F con L donde S_1 está seleccionado del grupo que incluye: aminoalquilo primario, aminoalquilo alifático secundario o amina aromática primaria; y S_2 está ausente o se selecciona del grupo que incluye: -$CO(CH_2)_3CO$-, -$CO(CH_2)_4CO$- (adipato) y -$CO(CH_2)_5CO$-.

Preferentemente, la molécula es soluble en agua.

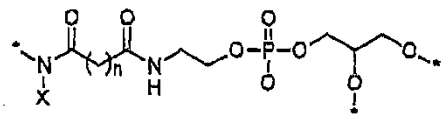
Preferentemente, la molécula se incorpora espontáneamente en una bicapa lipídica cuando una solución de la molécula se pone en contacto con la bicapa lipídica. Más preferentemente, la molécula se incorpora establemente en la bicapa lipídica.

Preferentemente, F, S_1, S_2 y L están covalentemente unidos.

Preferentemente, F está seleccionado del grupo que consiste en glucotopes que existen de forma natural o sintéticos.

Preferentemente, L es un lípido seleccionado del grupo que consiste en diacil- y dialquil-glicerolípidos, que incluyen glicerofosfolípidos. Más preferentemente, L está seleccionado del grupo que consiste en: diacilglicerolípidos, fosfatidato, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, fosfatidil glicerol y difosfatidil glicerol derivados de uno o más de ácido *trans*-3-hexadecenoico, ácido *cis*-5-hexadecenoico, ácido *cis*-7-hexadecenoico, ácido *cis*-9-hexadecenoico, ácido *cis*-6-octadecenoico, ácido *cis*-9-octadecenoico, ácido *trans*-9-octadecenoico, ácido *trans*-11-octadecenoico, ácido *cis*-11-octadecenoico, ácido *cis*-11-elcosenoico o ácido *cis*-13-docsenoico. Más preferentemente, el lípido deriva de uno o más ácidos grasos *cis*-desaturados. Lo más preferentemente, L está seleccionado del grupo que consiste en; 1,2-O-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-O-diestearil-sn-glicero-3-fosfatldiletanolamina (DSPE) y *rac*-9,2-dioleoilglicerol (DOG).

Preferentemente, L es un glicerofosfolípido y la molécula incluye la subestructura:



donde n = 3 a 5, X es H o C, y * es distinto de H. Preferentemente, n es 3.

Preferentemente, A (R-S_2) y S_1 están seleccionados para proporcionar una construcción de molécula sintética

soluble en agua.

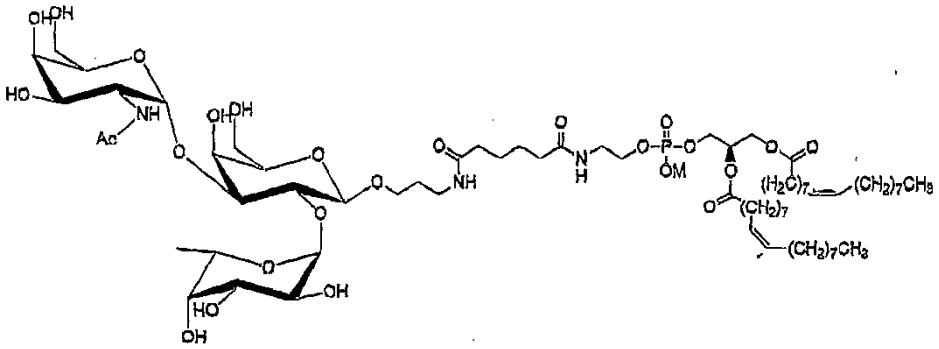
En una primera realización, F es un glucotope que existe de forma natural o sintético, Preferentemente, F es un glucotope que existe de forma natural o sintético que consiste en tres (trisacárido) o más unidades de azúcar. Más preferentemente, F es un glucotope seleccionado del grupo que consiste en las series de lacto-neo-tetraosilo, lactotetraosilo, lacto-nor-hexaosilo, lacto-iso-octaosilo, globoteraosilo, globo-neo-tetraosilo, globopentaosilo, gangliotetraosilo, gangliotriaosilo, gangliopentaosilo, isoglobotriaosilo, isoglobotetraosilo, mucotriaosilo y mucotetraosilo de oligosacáridos. Lo más preferentemente, F está seleccionado del grupo de glucotopes que comprende los azúcares terminales GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ; Galα1-3Galβ; Galβ; Galα1-3(Fucα1-2)Galβ; NeuAcα2-3Galβ; NeuAcα2-6Galβ; Fucα1-2Galβ; Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Galα1-4Galβ1-4Glc; GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc; GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc; o GalNAcβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc.

Cuando F es un glucotope, L es un glicerofosfolípido y S_2 está seleccionado del grupo que incluye: $-CO(CH_2)_3CO-$, $-CO(CH_2)_4CO-$ (adipato), $-CO(CH_2)_5CO-$ y $-CO(CH_2)_5NHCO(CH_2)_5CO-$, preferentemente S_1 es un aminoalquilo C_{3-5} seleccionado del grupo que consiste en: 3-aminopropilo, 4-aminobutilo o 5-aminopentilo. Más preferentemente, S_1 es 3-aminopropilo.

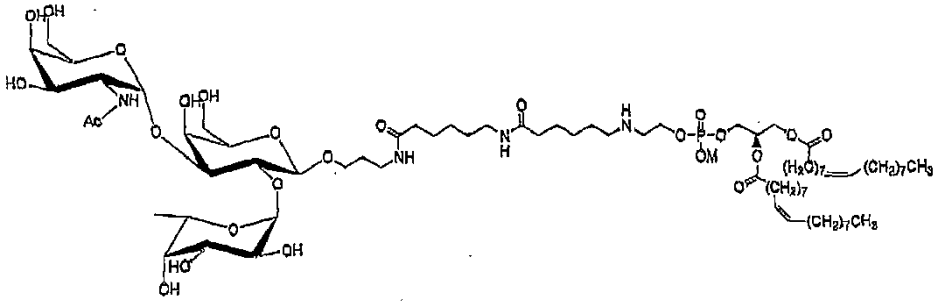
En una segunda realización, F es una molécula que media en una interacción célula-célula o célula-superficie. Preferentemente, F es hidrato de carbono con una afinidad por un componente expresado sobre una célula o superficie dirigida. Más preferentemente, F tiene una afinidad por un componente expresado sobre células epiteliales o matrices extracelulares. Aún más preferentemente, F tiene una afinidad por un componente expresado sobre las células epiteliales o la matriz extracelular del endometrio. Lo más preferentemente, el componente expresado sobre las células epiteliales o la matriz extracelular del endometrio puede ser un componente naturalmente expresado o un componente exógenamente incorporado.

En una tercera realización, F es una molécula que media en una interacción célula-soluto. Preferentemente, F es un ligando para una molécula de unión donde la presencia de la molécula de unión es diagnóstico de una afección patológica. Más preferentemente, F es un ligando para un anticuerpo (inmunoglobulina),

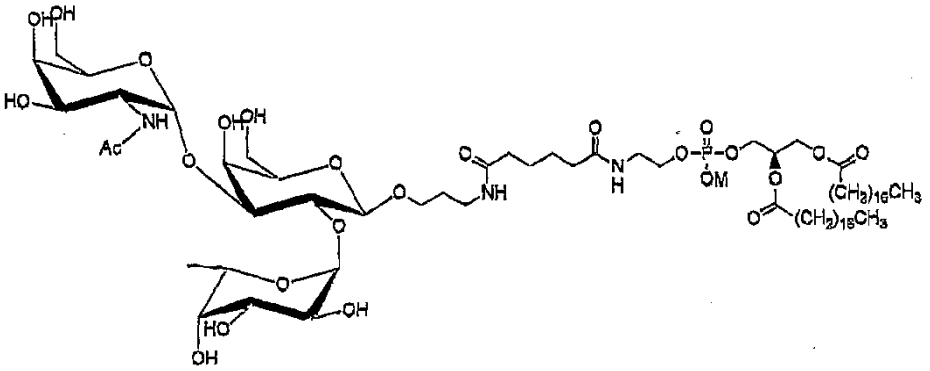
En realizaciones específicas, la construcción de molécula sintética soluble en agua tiene la estructura:



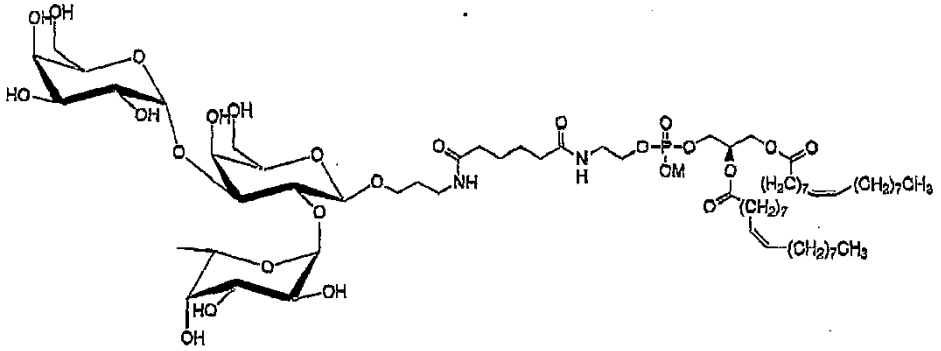
designada A_{ln}-sp-Ad-DOPE (I); la estructura:



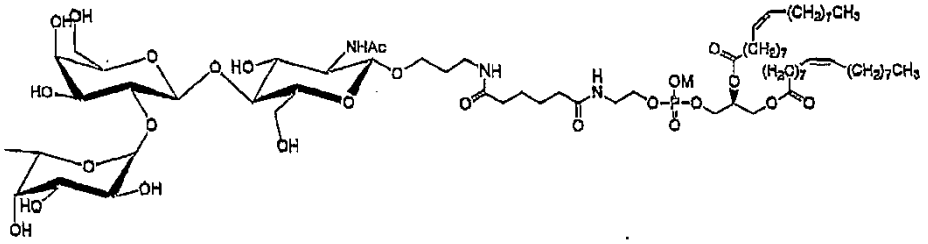
designada A_{tri}-spsp_1-Ad-DOPE (II); la estructura:



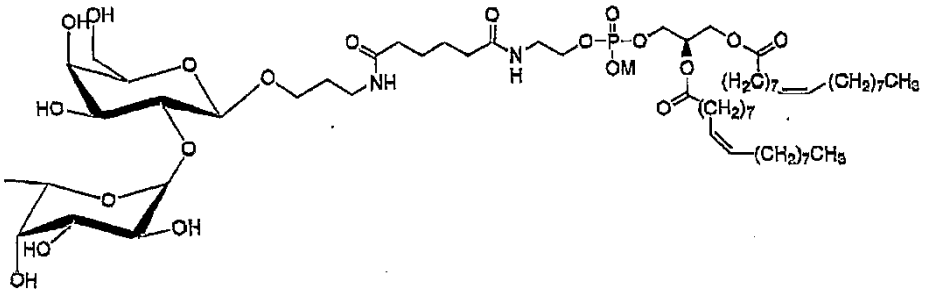
designada A_{tri}-sp-Ad-DSPE (III); la estructura



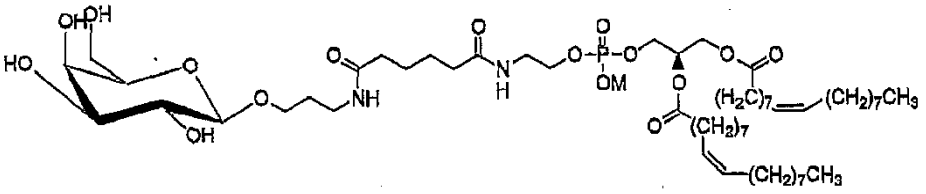
designada B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI); la estructura:



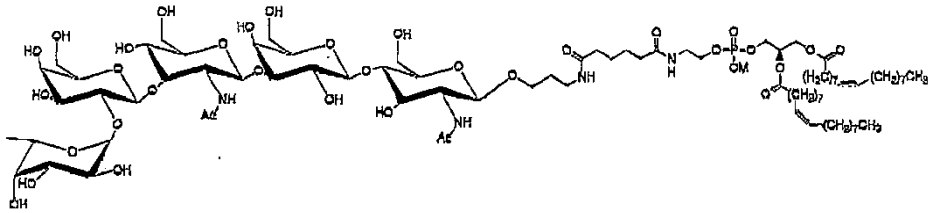
designada H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**); la estructura:



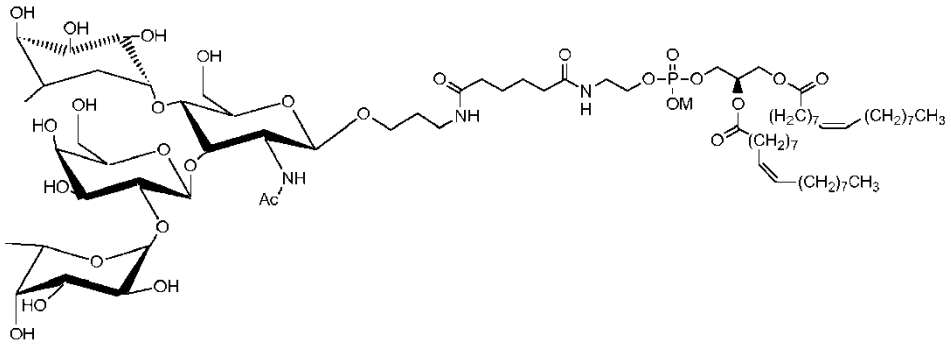
designada H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**); la estructura:



designada Galβ$_1$-sp-Ad-DOPE (**IX**); la estructura:



designada Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XII**); o la estructura:



designada Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XIII**).

M normalmente es H, pero puede estar sustituido por otro catión monovalente tal como Na^+, K^+ o NH_4^+.

En un **tercer** aspecto, la divulgación consiste en un anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética preparado por un método según el segundo aspecto de la divulgación.

En un cuarto aspecto, la divulgación consiste en un método de efectuar cambios cualitativos y/o cuantitativos en los antígenos de superficie expresados por una célula o estructura multicelular que incluye la etapa:

1. Poner en contacto una suspensión de la célula o estructura multicelular con una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 durante un tiempo y a una temperatura suficiente para efectuar el cambio donde la estructura multicelular no es un embrión humano.

Preferentemente, la célula o estructura multicelular es de origen humano o murino.

Preferentemente, la concentración del anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética en la suspensión está en el intervalo 0,1 a 10 mg/ml.

Preferentemente, la temperatura está en el intervalo 2 a 37 ºC. Más preferentemente, la temperatura está en el intervalo 2 a 25 ºC. Lo más preferentemente, la temperatura está en el intervalo 2 a 4 ºC.

En una primera realización, la célula es un glóbulo rojo.

En esta realización, preferentemente F está seleccionado del grupo de glucotopes que comprende los azúcares terminales GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ; Galα1-3Galβ; Galβ; Galα1-3(Fucα1-2)Galβ; NeuAcα2-3Galβ; NeuAcα2-6Galβ; Fucα1-2Galβ; Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-

En una primera realización, la célula es un glóbulo rojo que incorpora una membrana sintética soluble en agua 3)Galβ; Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Galα1-4Galβ1-4Glc; GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc; GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc; o GalNAcβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc. Más preferentemente, F está seleccionado del grupo de glucotopes que consiste en los oligosacáridos GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ y Galα1-3(Fucα1-2)Galβ.

Preferentemente, la construcción de molécula sintética está seleccionada del grupo que incluye: A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**); A_{tri}-spsp$_1$-Ad-DOPE (**II**); A_{tri}-sp-Ad-DSPE (**III**); B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**); H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**); H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**); Galβ$_i$-sp-Ad-DOPE (**IX**); Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XII**); y Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XIII**).

En una segunda realización, la estructura multicelular es un embrión no humano.

En esta realización, preferentemente F es una molécula de unión donde la molécula de unión tiene una afinidad por un componente expresado sobre las células epiteliales o la matriz extracelular del endometrio.

El componente expresado sobre las células epiteliales o la matriz extracelular del endometrio puede ser un componente naturalmente expresado o un componente exógenamente incorporado.

Preferentemente, el anclaje de membrana sintética o la construcción de molécula sintética está seleccionado del grupo que incluye: A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**); A_{tri}-$spsp_1$-Ad-DOPE (**II**); A_{tri}-sp-Ad-DSPE (**III**); B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**); H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**); H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**); Galβ_i-sp-Ad-DOPE (**IX**); Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XII**); y Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XIII**).

En una tercera realización, la célula es un glóbulo rojo.

En esta realización, preferentemente F es un ligando para una molécula de unión donde la presencia de la molécula de unión es diagnóstico de una afección patológica. Más preferentemente, F es un ligando para un anticuerpo (inmunoglobulina).

En un **quinto** aspecto, la divulgación consiste en una célula o estructura multicelular que incorpora un anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética según el primer o tercer aspecto de la divulgación.

Preferentemente, la célula o estructura multicelular es de origen humano o murino. El anclaje o construcción de molécula sintética se selecciona del grupo que incluye: A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**); A_{tri}-$spsp_1$-Ad-DOPE (**II**); A_{tri}-sp-Ad-DSPE (**III**); B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**); H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**); H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**); Galβ_i-sp-Ad-DOPE (**IX**); Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XII**); y Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XIII**).

En una segunda realización, la estructura multicelular es un embrión no humano que incorpora un anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética seleccionado del grupo que consiste en: A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I); A_{tri}-$spsp_1$-Ad-DOPE (**II**); A_{tri}-sp-Ad-DSPE (**III**); B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**); H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**); H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**); Galβ_i-sp-Ad-DOPE (**IX**)**;** Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XII**)**;** y Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XIII**).

En un **sexto** aspecto, la invención consiste en un kit que comprende una preparación secada o solución de un anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética según el primer o tercer aspecto de la invención.

Preferentemente, el anclaje de membrana sintética o soluble en agua construcción de molécula sintética según el primer o tercer aspecto de la invención está seleccionado del grupo que consiste en: A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I); A_{tri}-$spsp_1$-Ad-DOPE (**II**)**;** A_{tri}-sp-Ad-DSPE (**III**)**;** B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**); H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**); H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**); Galβ_i-sp-Ad-DOPE (**IX**); Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XII**); y Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XIII**).

En un **séptimo** aspecto, la invención consiste en un kit que comprende una suspensión en una solución de suspensión de células o estructuras multicelulares según el quinto aspecto de la invención.

Preferentemente, la solución de suspensión está sustancialmente libre de lípido.

Preferentemente, la célula o estructura multicelular es de origen humano o murino.

Preferentemente, las células son glóbulos rojos que no expresan naturalmente el antígeno A o B e incorporan un anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética seleccionado del grupo que consiste en: A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**); A_{tri}-$spsp_1$-Ad-DOPE (**II**); A_{tri}-sp-Ad-DSPE (**III**); B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**); H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**); H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**); Galβ_i-sp-Ad-DOPE (**IX**); Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XII**); y Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XIII**). Más preferentemente, las células son controles de sensibilidad.

En un **octavo** aspecto, la invención consiste en una preparación farmacéutica que comprende una preparación secada o solución de un anclaje de membrana sintética soluble en agua o construcción de molécula sintética según el primer o cuarto aspecto de la invención.

Preferentemente, la preparación farmacéutica está en una forma para administración por inhalación.

Preferentemente, la preparación farmacéutica está en una forma para administración por inyección.

En un **noveno** aspecto, la divulgación consiste en una preparación farmacéutica que comprende células o estructuras multicelulares según el quinto aspecto de la divulgación.

Preferentemente, las células o estructuras multicelulares son de origen humano o murino.

Preferentemente, la preparación farmacéutica está en una forma para administración por inhalación.

Preferentemente, la preparación farmacéutica está en una forma para administración por inyección.

Descripción detallada

Las construcciones de molécula sintética de la invención se incorporan espontáneamente y establemente en una bicapa lipídica, tal como una membrana, cuando una solución de la molécula se pone en contacto con la bicapa lipídica. Aunque no se desee quedar ligado a teoría, se cree que la inserción en la membrana de las colas lipídicas del lípido (L) está termodinámicamente favorecida. Se cree que la posterior disociación de la construcción de molécula sintética de la membrana lipídica está termodinámicamente desfavorecida. Sorprendentemente, también se ha encontrado que las construcciones de molécula sintética identificadas en el presente documento son solubles en agua.

Las construcciones de molécula sintética de la invención se usan para transformar células produciendo cambios cualitativos y/o cuantitativos en los antígenos de superficie expresados. Se reconocerá que la transformación de las células según la invención se distingue de la transformación de células por ingeniería genética. La invención proporciona transformación fenotípica de células sin transformación *genética*.

En el contexto de esta descripción, el término "transformación" en referencia a células se usa para referirse a la inserción o incorporación en la membrana celular de construcciones de molécula sintética exógenamente preparadas, efectuando así cambios cualitativos y cuantitativos en los antígenos de superficie celular expresados por la célula.

Las construcciones de molécula sintética de la divulgación comprenden un antígeno (F) unido a una porción de lípido (o resto) (L) mediante un espaciador (S_1-S_2). Las construcciones de molécula sintética pueden prepararse por la condensación de un aminoalquilo primario, aminoalquilo alifático secundario o derivado de amina aromático primario del antígeno con un lípido activado. Se han revisado métodos de preparación de neoglucoconjugados (Bovin, N. Biochem. Soc. Symp., 69, 143-160).

Puede lograrse una transformación fenotípica deseada usando las construcciones de molécula sintética de la invención en un método de una etapa o un método de dos etapas. En el método de una etapa la construcción de molécula sintética soluble en agua (F-S_1S_2-L) comprende el antígeno de superficie como F.

En el método de dos etapas la construcción de molécula sintética (F-S_1-S_2-L) comprende un antígeno (F) que sirve de grupo funcional al que un antígeno de superficie puede unirse tras la inserción de la construcción de molécula sintética en la membrana. El grupo funcional puede ser un grupo tal como una lecitina, avidina o biotina. Cuando se usa en el método de dos etapas, la construcción de molécula sintética está actuando de anclaje de membrana sintética.

Según la divulgación, el aminoalquilo primario, aminoalquilo alifático secundario o amina aromática primaria y el activador del lípido se seleccionan para proporcionar una construcción de molécula sintética que es soluble en agua y se incorporará espontáneamente y establemente en una bicapa lipídica cuando una solución de la construcción de molécula sintética se ponga en contacto con la bicapa lipídica.

En el contexto de esta descripción, la expresión "soluble en agua" significa que un sistema monofásico estable se forma cuando la construcción de molécula sintética se pone en contacto con agua o solución salina (tal como PBS) en ausencia de disolventes orgánicos o detergentes, y el término "solución" tiene un significado correspondiente.

En el contexto de esta descripción, la expresión "incorporar establemente" significa que las construcciones de molécula sintética se incorporan en la bicapa lipídica o membrana con intercambio posterior mínimo entre la bicapa lipídica o membrana y el entorno acuoso externo de la bicapa lipídica o membrana.

La selección del aminoalquilo primario, aminoalquilo alifático secundario o amina aromática primaria y el activador depende de las propiedades fisicoquímicas del antígeno (F) que va a unirse al lípido (L).

Se entenderá por aquellos expertos en la materia que para una interacción no específica, tal como la interacción entre un diacil- o dialquil-glicerolípido y una membrana, estructurales y estereoisómeros de lípidos que existen de forma natural pueden ser funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, se contempla por los inventores que el 2-fosfato de diacilglicerol podría ser sustituido por fosfatidato (3-fosfato de diacilglicerol). Además, se contempla por los inventores que la configuración absoluta del fosfatidato puede ser cualquiera de R o S.

Los inventores han determinado que para preparar construcciones de molécula sintética de la invención donde el antígeno (F) es un oligosacárido seleccionado del grupo de glucotopes para los antígenos A, B y H de los grupos sanguíneos ABO, el aminoalquilo primario, aminoalquilo alifático secundario o amina aromática primaria, y el activador, deben seleccionarse para proporcionar un espaciador (S_1-S_2) con una estructura según una de aquellas presentadas aquí:

Estructuras alternativas de S_1-S_2 para una construcción de molécula sintética soluble en agua (F-S_1-S_2-L) donde F es un hidrato de carbono (u otro antígeno) con propiedades fisicoquímicas similares a la porción de hidrato de carbono de los antígenos A, B o H de los grupos sanguíneos ABO y L es un glicerofosfolípido (n, m independientemente = 2 a 5)	
S_1 está seleccionado de:	S_2 está seleccionado de:
	$-CO(CH_2)_nCO-$
$-O(CH_2)nNH-$	
	o
	$-CO(CH_2)_mNHCO(CH_2)_nCO-$

Se entenderá por un experto en la materia que una vez la estructura del espaciador (S_1-S_2) ha sido determinada para una clase dada de antígenos, puede ser adoptada la misma estructura del espaciador para preparar construcciones de molécula sintética de otras clases de antígeno con propiedades fisicoquímicas similares.

Por ejemplo, la estructura del espaciador para las construcciones de molécula sintética (F-S_1-S_2-L), donde F es un glucotope de los antígenos A, B y H de los grupos sanguíneos ABO, puede ser la estructura del espaciador seleccionada para preparar construcciones de molécula sintética de otros antígenos con propiedades fisicoquímicas similares a los glucotopes de los antígenos A, B y H de los grupos sanguíneos ABO.

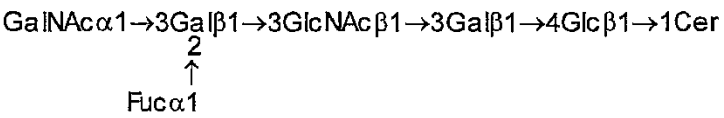
En principio, el glucotope de un amplio intervalo de glucolípidos o glucoproteínas relacionados con grupos sanguíneos podrían ser el antígeno (F) de la construcción de molécula sintética F-S_1-S_2-L donde S_1-S_2-L es idéntico o equivalente a la porción correspondiente de las construcciones de molécula sintética designadas A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**), A_{tri}-spsp_1-Ad-DOPE (**II**), A_{tri}-sp-Ad-DSPE (**III**), B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**), H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**), H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**), Galβ-sp-Ad-DOPE (**IX**), Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XII**), y Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc-sp-Ad-DOPE (**XIII**).

Estructuras de glucolípidos y glucoproteínas relacionadas con grupos sanguíneos conocidos (véase referencias) se proporcionan en la siguiente lista:

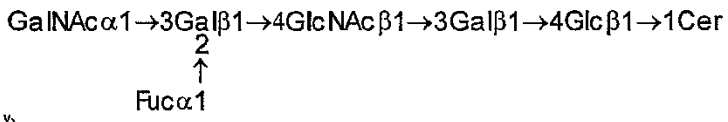
Glucolípidos*

(*En general, para casi todos los ejemplos de antígenos A, el azúcar A terminal GalNAc puede sustituirse con el azúcar B Gal. Además, la falta de cualquiera del determinante A o B crea el determinante H equivalente)

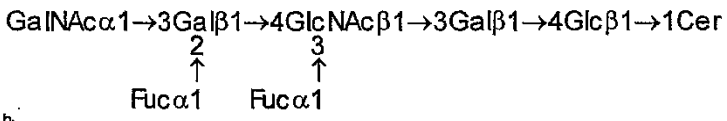
A-6-1



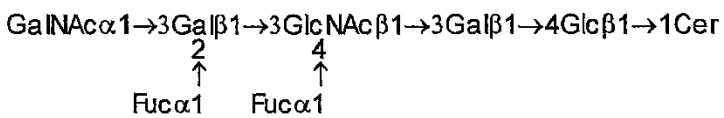
A-6-2



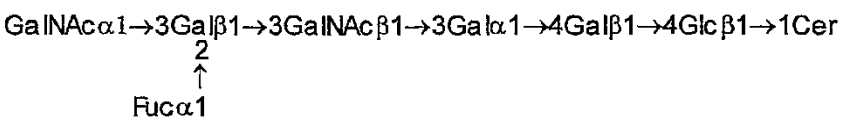
A-7-2 (ALe^y)



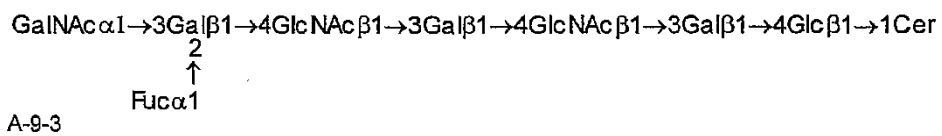
A-7-1 (ALe^b)



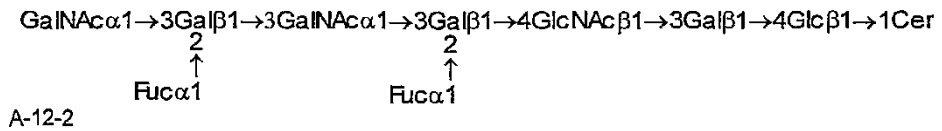
A-7-4



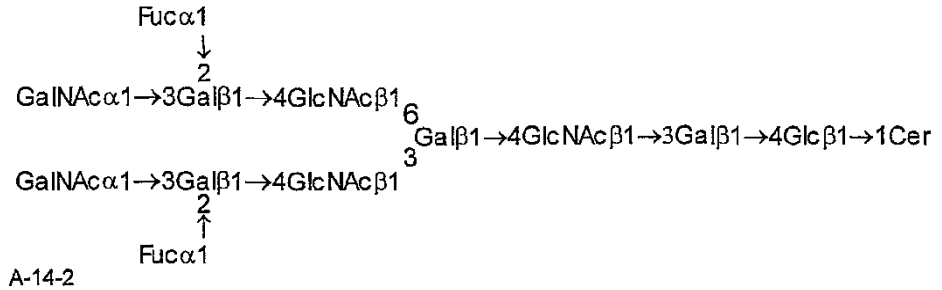
A-8-2



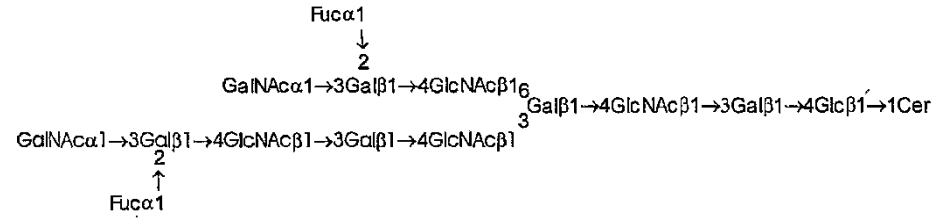
A-9-3



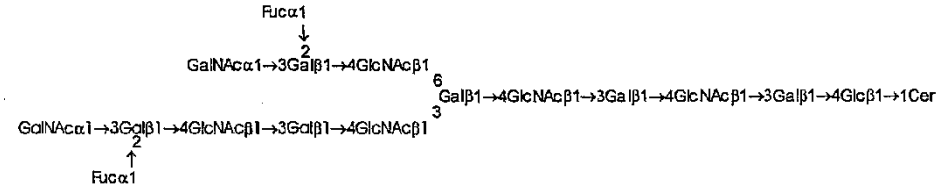
A-12-2



A-14-2



A-16-2



Lactosilceramida

Galβ1→4Glcβ1→1Cer

Hematósido/G_{M3}

NeuAcα2→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer

Lactotriaosilceramida

GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer

Globotriaosilceramida/P^K

Galα1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer

Globósido/P

GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer

Paraglobósido/neolactotetraosilceramida

Galβ1→3GlcNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer

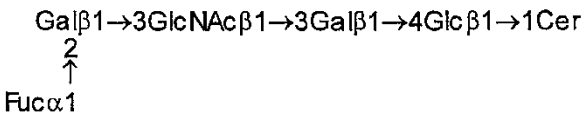
Le^c-4/Lactotetraosilceramida

Galβ1→3GlcNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer

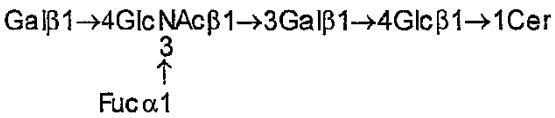
Sialoil paraglobósido/sialoil neolactotetraosilceramida

NeuAcα2→3Galp1→4GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer

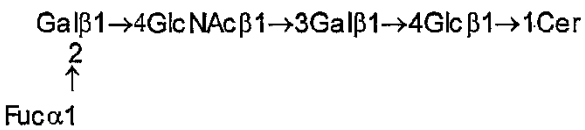
H-5-1



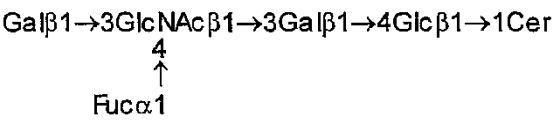
Le^x-5



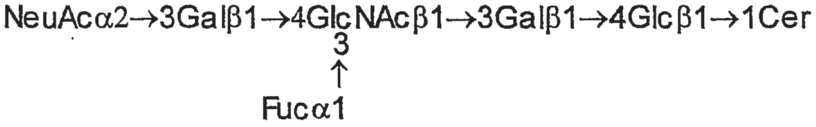
H-5-2



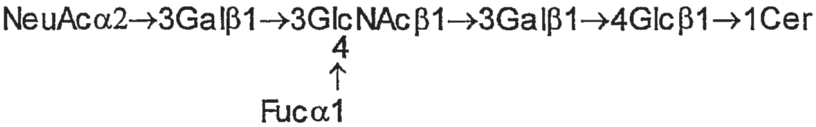
Le^a-5



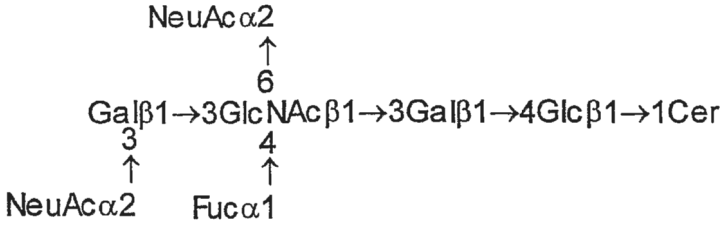
Sialil Le^x



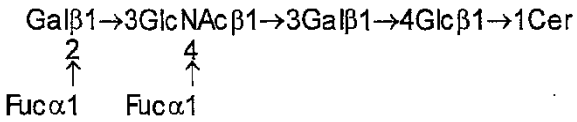
Sialil Le^a-6/antígeno de cáncer gastrointestinal (GICA o Ca 19-9)



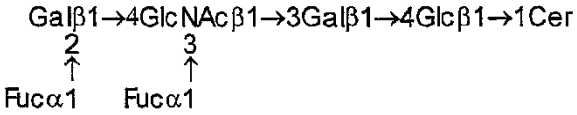
Disialoil Le^a-7



Le^b-6



Le^y-6



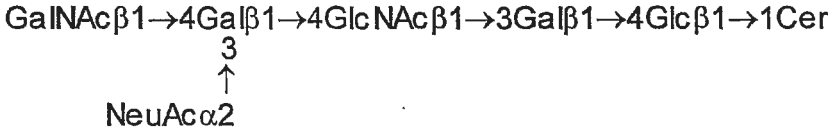
Similar a P

GalNAcβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer

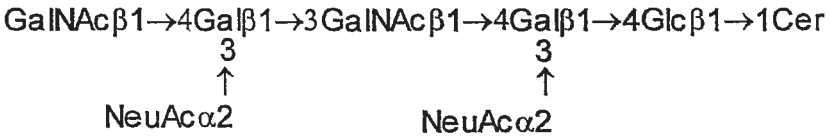
Antígeno de Forssman

GalNAcα1→3GalNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→4Glcβ1→1Cer

Eritrocito Cad



Antígeno de hepatocarcinoma Cad

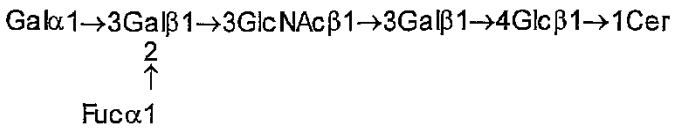


P_1

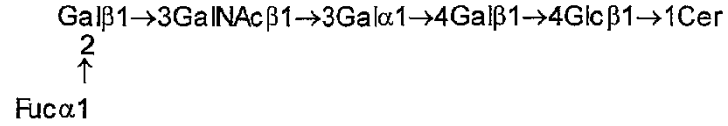
Galα1→4Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer LKE/'GL 7/SSEA-4

NeuAcα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→3Galgα1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer

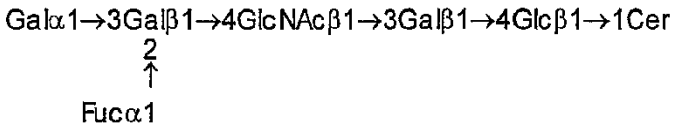
B-6-1



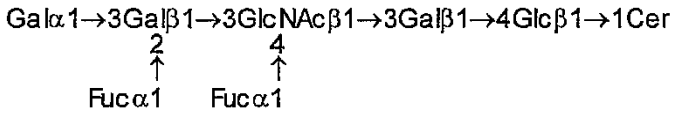
H-6-4



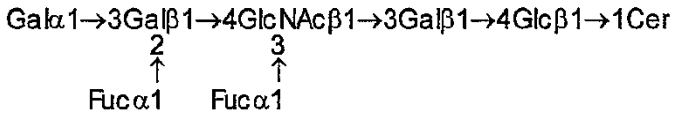
B-6-2



BLe^b-7



BLe^y-7



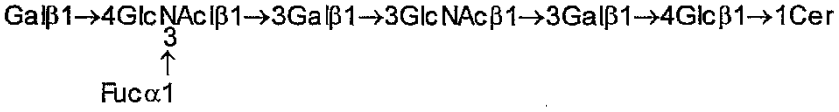
i antígeno/lacto-N-*nor*-hexaosilceramida

Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer

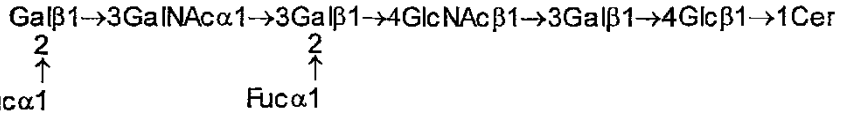
Sialil-*nor*-hexaosilceramida/sialoil-lacto-N-*nor*-hexaosilceramida

NeuAcα2→3Galβ1→4GlcNAclβ1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer

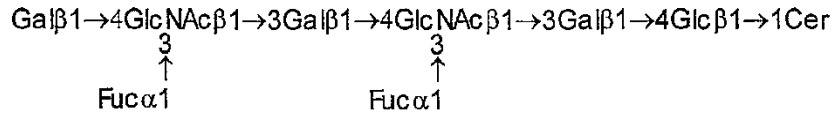
Le^x-7



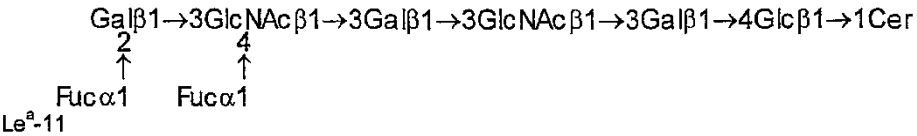
H-8-3



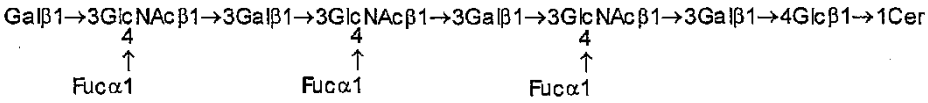
Le^x-8



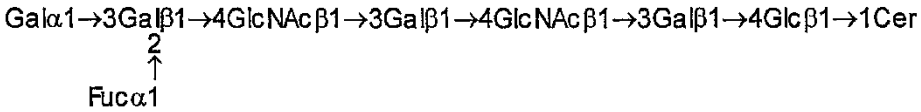
Le^b-8



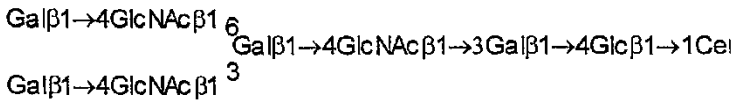
Le^a-11



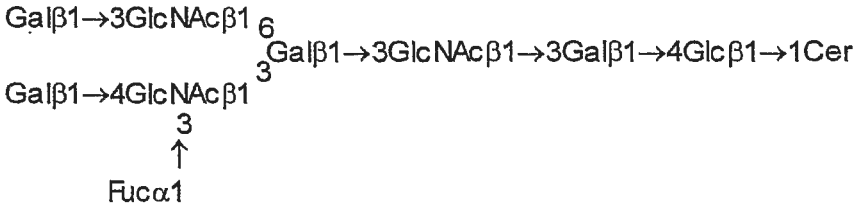
B-8-2



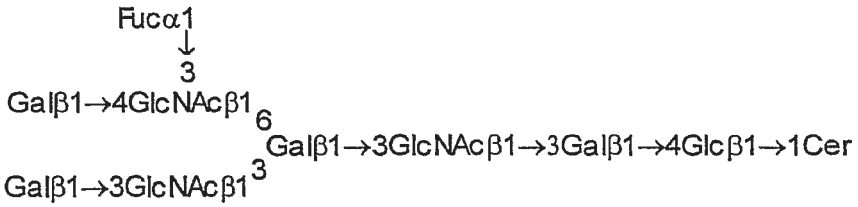
Antígeno I



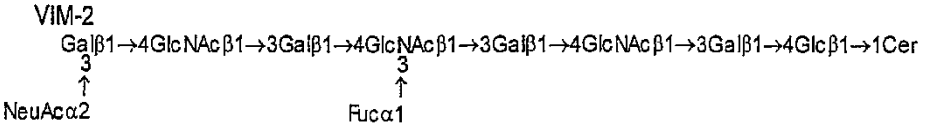
Le^c-9 (esqueleto fucosilado)



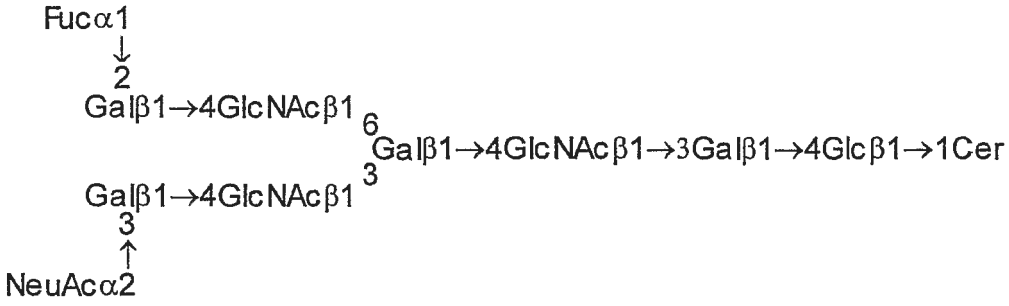
Le^c-9 (rama fucosilada)



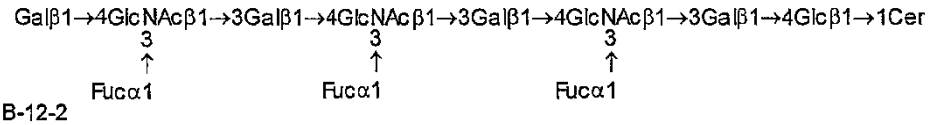
ViM-2



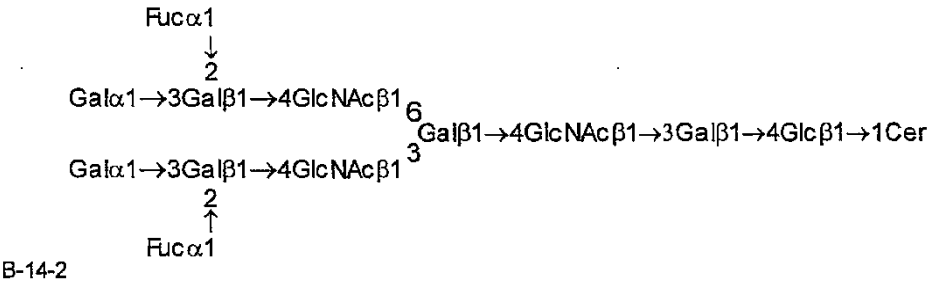
Antígeno FI de eritrocitos



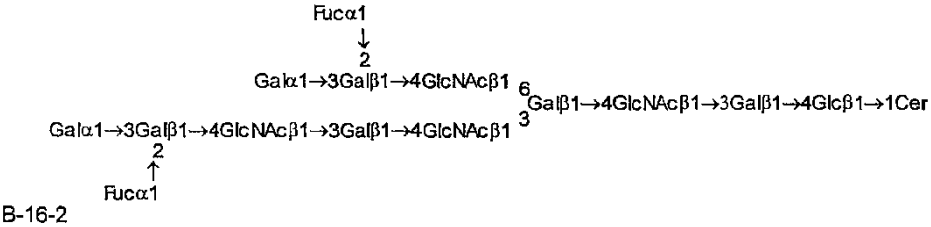
Le^x-11



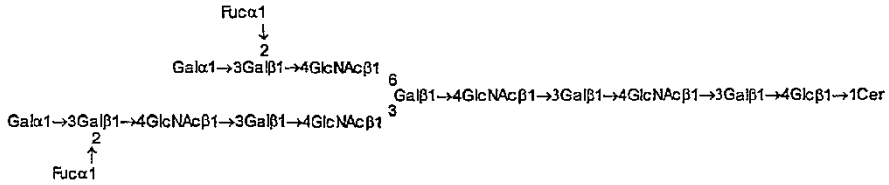
B-12-2



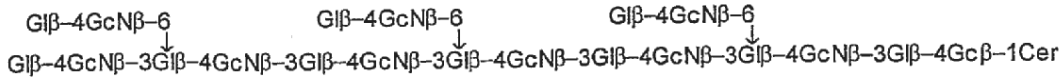
B-14-2



B-16-2

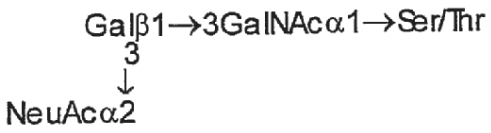


Poliglucosilceramida activa en I

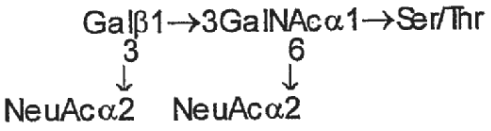


Glucoproteínas O-unidas

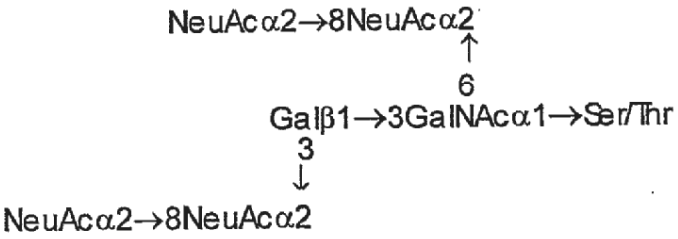
Monosialotrisacárido



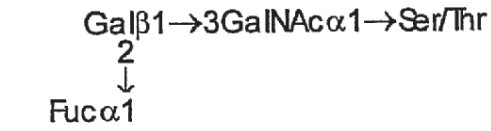
Disialotetrasacárido



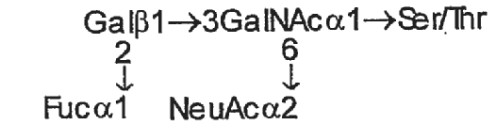
Oligosacárido de grupo disialoílo



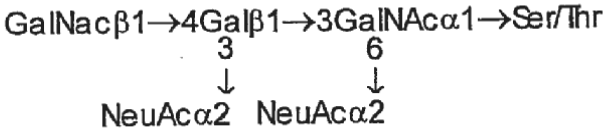
Trisacárido activo en H



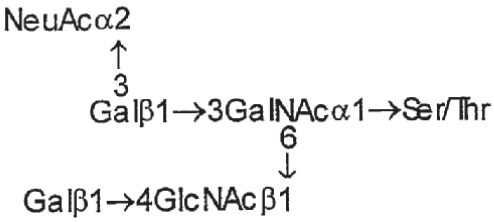
Tetrasacárido activo en H sialilado



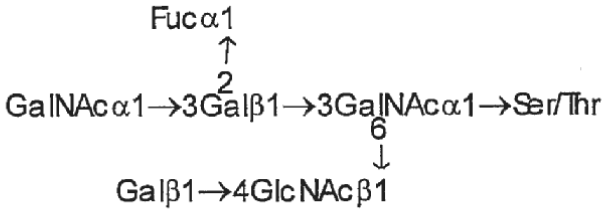
Oligosacárido Cad



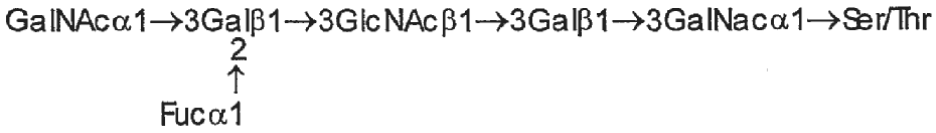
Oligosacárido de GlcNAc



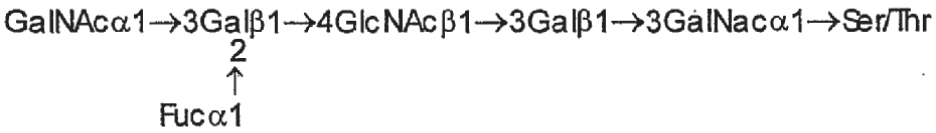
Oligosacárido de mucina / glucoproteína activa en A



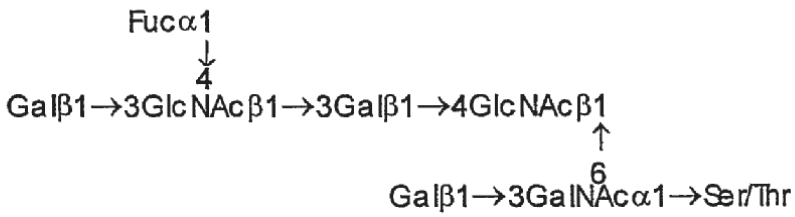
Glucoproteína 6a activa en A de quiste de ovario



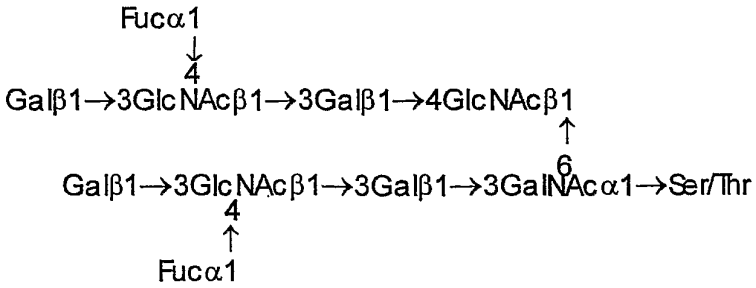
Glucoproteína 6b activa en A de quiste de ovario



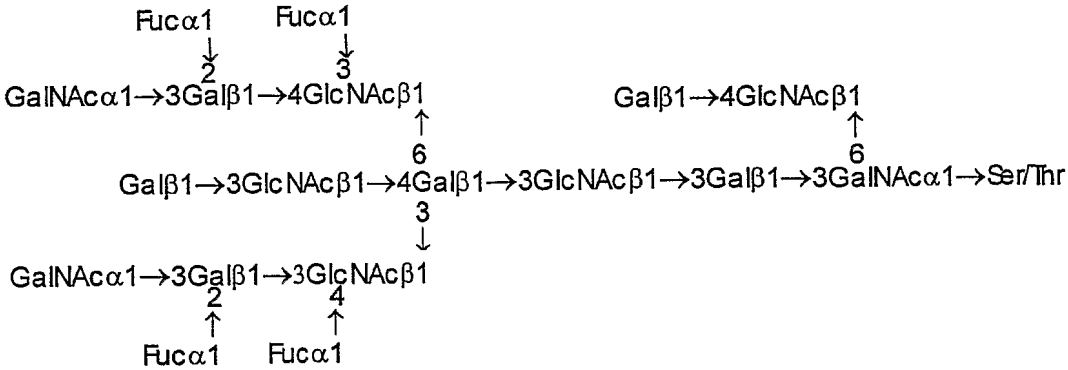
Glucoproteína 7 activa en Le^a de quiste de ovario



Glucoproteína 10 activa en Le[a] de quiste de ovario

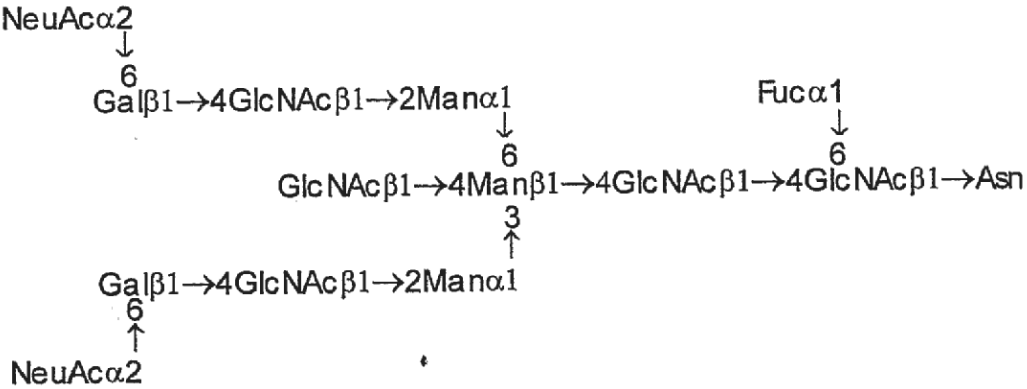


Glucoproteína 18 activa en A de quiste de ovario

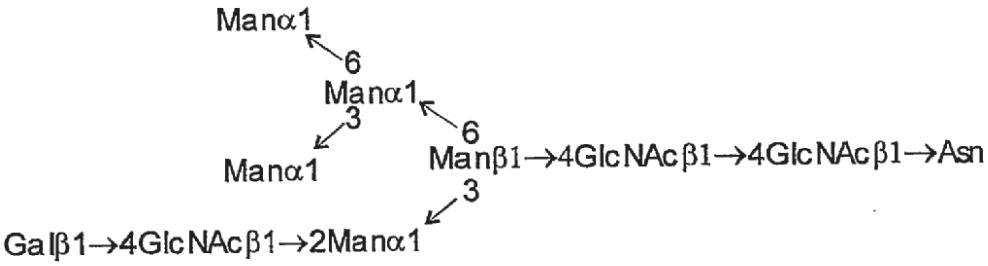


Glucoproteínas N-unidas

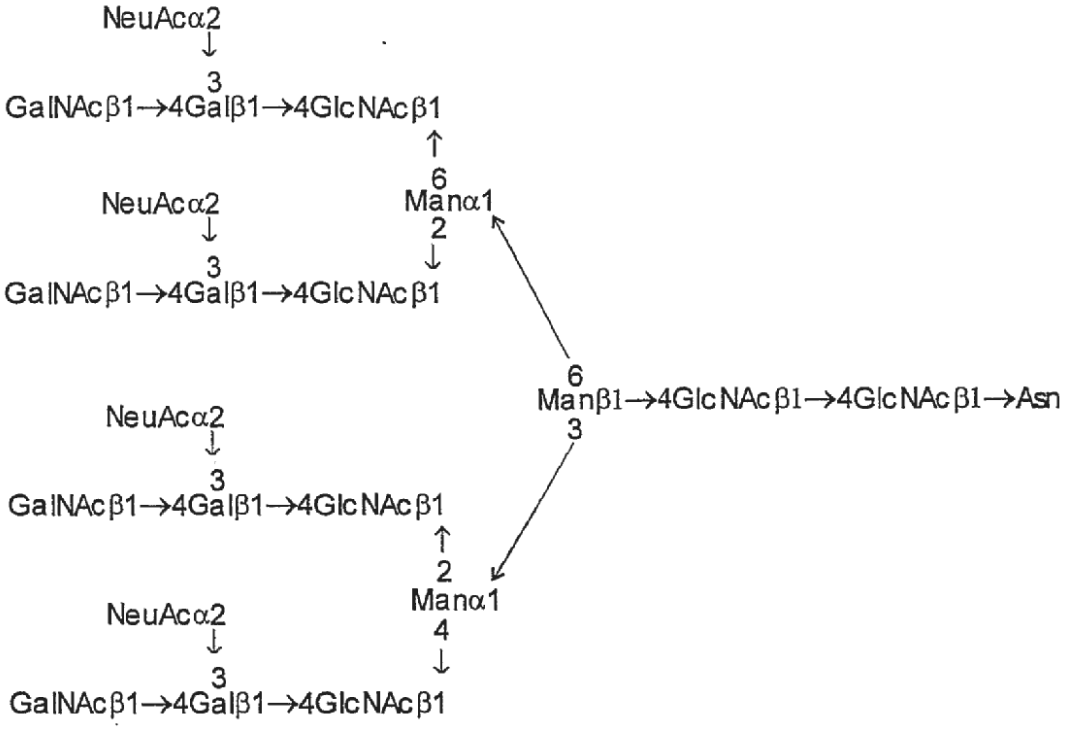
Tipo complejo / cadena estable a álcali



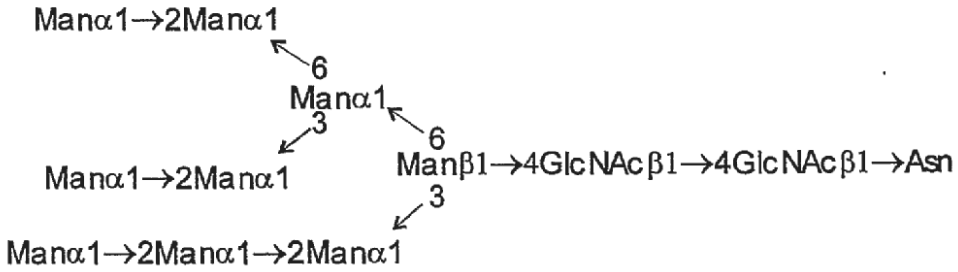
Tipo híbrido



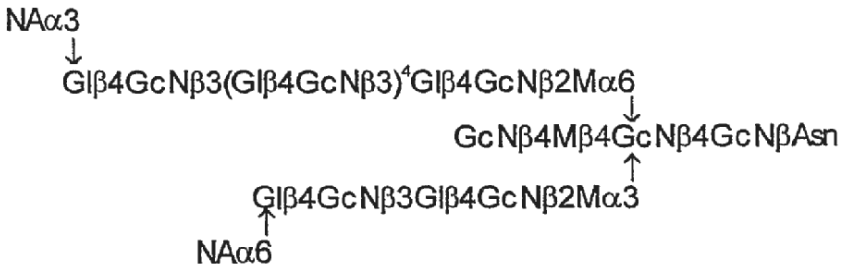
Glucoproteína de Tamm-Horsfall



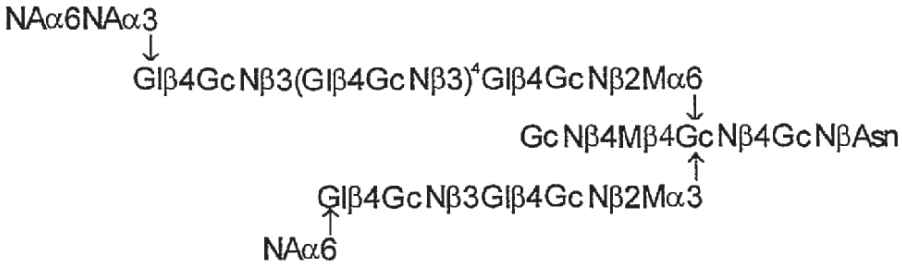
Tipo alto en manosa



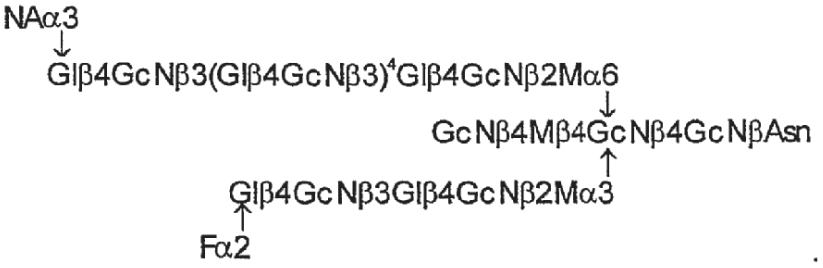
Antígeno de eritrocitos fetal de disialilo



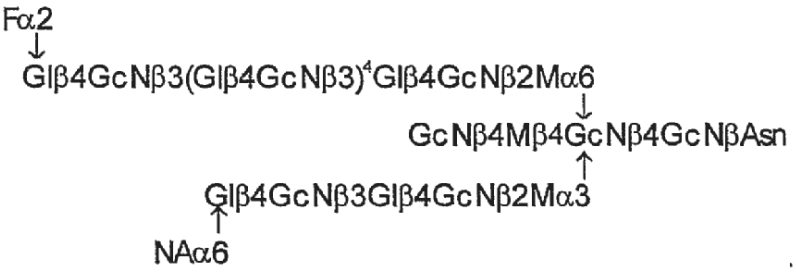
Antígeno de eritrocitos fetal de trisialoílo (grupo disialoílo en la rama)



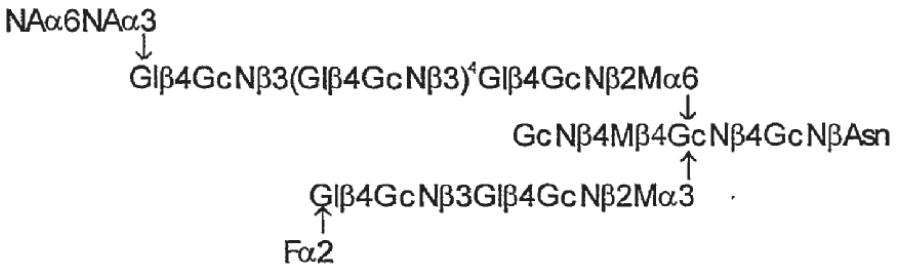
Antígeno de eritrocitos fetal de monofucosil-monosialilo (esqueleto fucosilado)



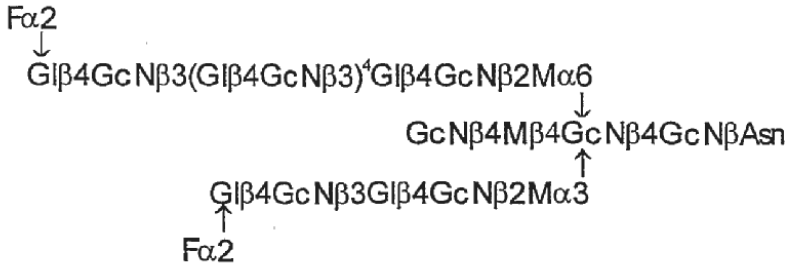
Antígeno de eritrocitos fetal de monofucosil-monosialilo (rama fucosilada)



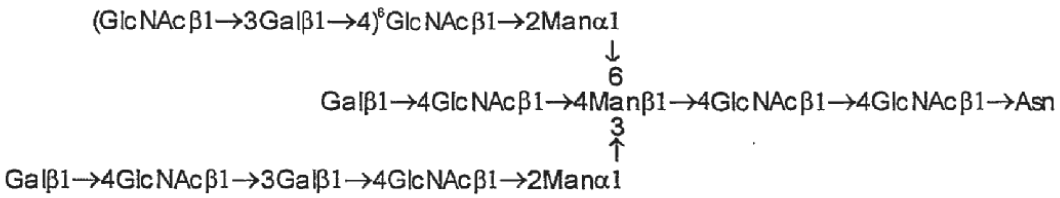
Antígeno de eritrocitos fetal de monofucosil-monosialilo (grupo disialilo en la rama)



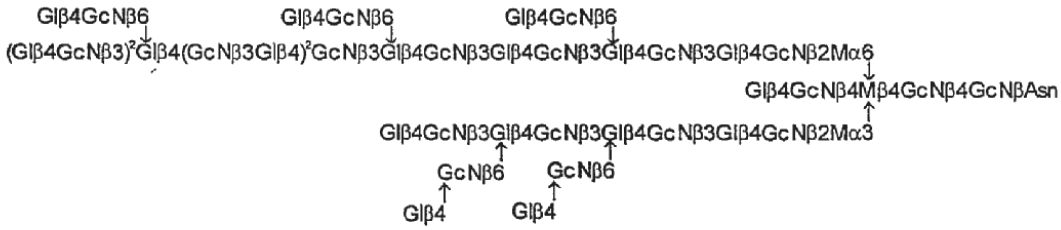
Antígeno de eritrocitos fetal de difucosilo



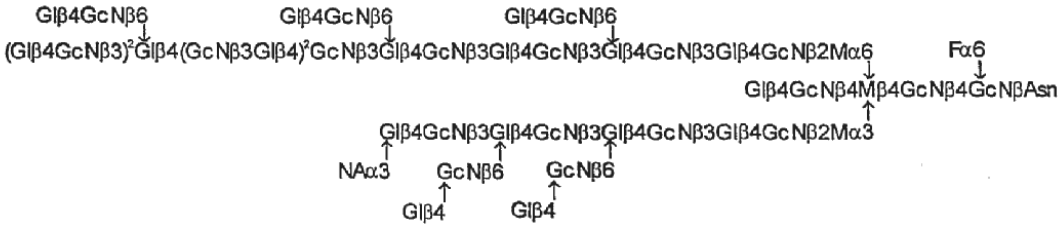
Lactosaminoglucano fetal



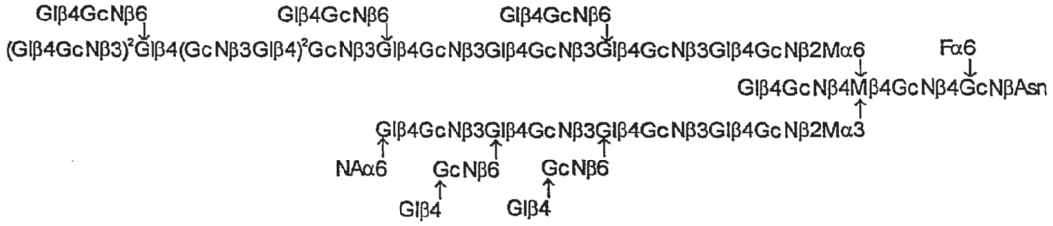
Lactosaminoglucano adulto



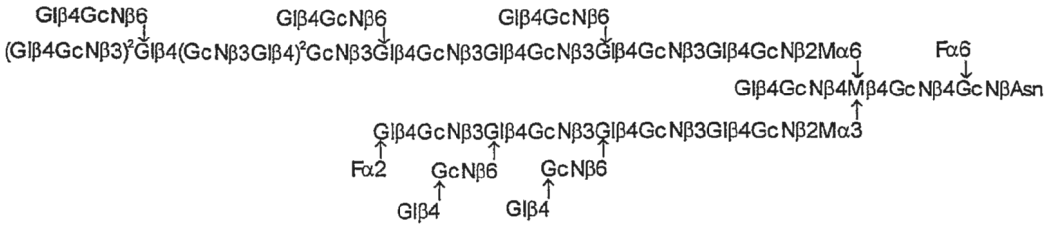
Antígeno de eritrocitos adulto de monofucosil-monosialoílo



Antígeno de eritrocitos adulto de monofucosil-monosialoílo



Antígeno de eritrocitos adulto de difucosilo



Clave: Gl = D-Gal, Gc = D-Glc, GcN = D-GlcNAc, M = D-Man, F = L-Fuc, NA = NeuAc.

Se entenderá por aquellos expertos en la materia que las construcciones de molécula sintética (F-S_1-S_2-L) de la invención donde F es un oligosacárido pueden usarse como "glucolípidos sintéticos" y sustituirse por glucolípidos obtenidos de fuentes biológicas (botánicas o zoológicas).

En el contexto de esta descripción de la invención, el término "glucolípido" significa un hidrato de carbono que contiene lípido de carácter anfipático que incluye: glicerolípidos glucosilados, tales como fosfoglicéridos y glucosilglicéridos glucosilados; esfingolípidos glucosilados (glucolípidos neutros) tales como glucosilceramidas o cerebrósidos; y gangliósidos (glucolípidos ácidos).

En el contexto de esta descripción de la invención, la expresión "antígeno unido a glucolípidos" significa un hidrato de carbono que contiene lípido en el que un antígeno (por ejemplo, una proteína) está unido al glucolípido mediante la porción de hidrato de carbono de la molécula. Ejemplos de antígenos unidos a glucolípidos incluyen proteínas unidas a GPI.

Se entenderá por aquellos expertos en la materia que un glucolípido es él mismo un antígeno. El término y expresión "glucolípido" y "antígeno unido a glucolípidos" se usan para distinguir entre moléculas que existen de forma natural donde el antígeno es el glucolípido y moléculas que existen de forma natural donde el antígeno está unido al glucolípido mediante la porción de hidrato de carbono del glucolípido. Por analogía, las construcciones de molécula sintética de la invención podrían describirse como tanto "glucolípidos sintéticos" como anclajes de membrana sintética hasta el punto que el antígeno puede ser el glucolípido sintético por sí mismo o unido al glucolípido sintético.

Se entenderá por aquellos expertos en la materia que la porción de hidrato de carbono de un glucolípido puede modificarse y unirse a otros antígenos por los métodos descritos en la memoria descriptiva que acompaña a la solicitud internacional N.º PCT/NZ2003/00059 (publicada como WO03087346).

En el contexto de esta descripción de la invención, el término "glucotope" se usa para referirse al determinante antigénico localizado en la porción de hidrato de carbono de un glucolípido. La clasificación de antígenos de glucolípido en la serología de los grupos sanguíneos se basa en la estructura de la porción de hidrato de carbono del glucolípido.

En la serología de los grupos sanguíneos se sabe que los azúcares terminales de los glucotopes de los antígenos A son GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ, y los azúcares terminales de los glucotopes de los antígenos B son Galα1-3(Fucα1-2)Galβ. La incorporación en la membrana de RBC de construcciones de molécula sintética solubles en agua de la invención donde F es GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ o Galα1-3(Fucα1-2)Galβ proporciona RBC que son serológicamente equivalentes a RBC que expresan antígeno A o antígeno B, respectivamente.

Los tres azúcares terminales de la porción de hidrato de carbono del antígeno A o B que existe de forma natural son

el determinante de los grupos sanguíneos A y B. Los cuatro o cinco azúcares terminales de la porción de hidrato de carbono del antígeno A que existe de forma natural son el determinante de los subgrupos sanguíneos A A tipo 1, A tipo 2, etc. Por consiguiente, los RBC que incorporan las construcciones de molécula sintética de la invención pueden usarse para caracterizar y discriminar entre reactivos de tipificación sanguínea (anticuerpos) de diferente especificidad.

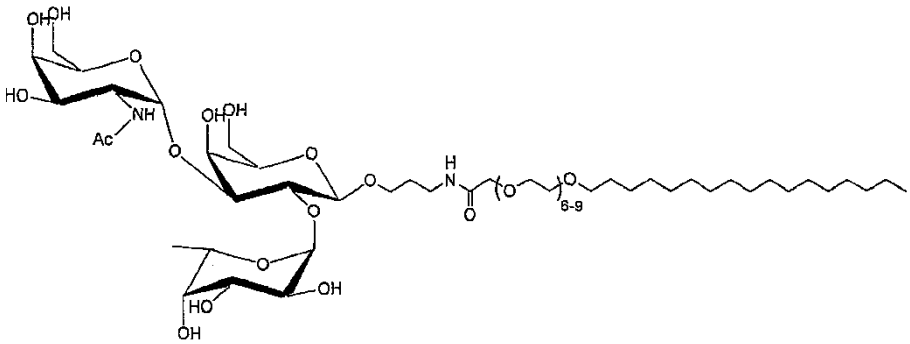
Se contempla por los inventores construcciones de molécula sintética solubles en agua de la invención que excluyen una porción de hidrato de carbono. Antígenos distintos de hidratos de carbono u oligosacáridos, pero con propiedades fisicoquímicas similares, pueden estar sustituidos por F en los "glucolípidos sintéticos" descritos.

Construcciones de molécula sintética de la invención que comprenden un antígeno (F) con diferentes propiedades fisicoquímicas para aquellos de hidratos de carbono u oligosacáridos también son contempladas por los inventores. Pueden prepararse construcciones de molécula sintética solubles en agua que comprenden estos antígenos seleccionando diferentes espaciadores.

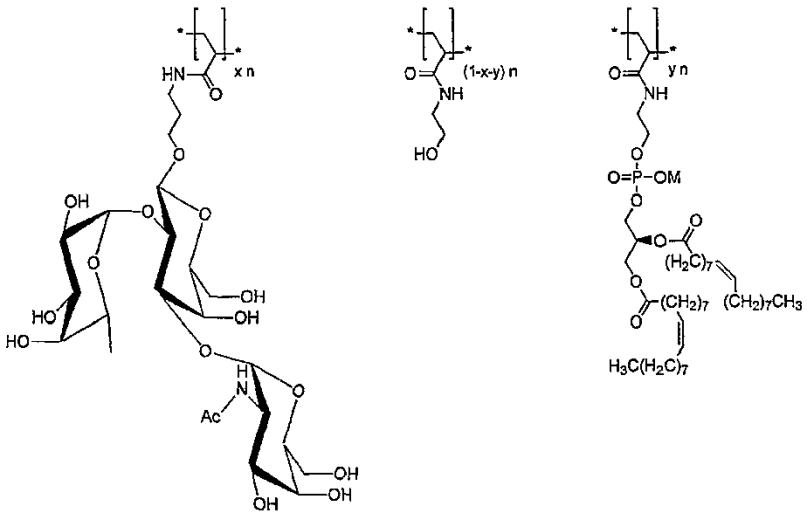
Las ventajas proporcionadas por las construcciones de molécula sintética de la presente invención se acumularán cuando se use en la práctica de las invenciones descritas en las memorias descriptivas para las solicitudes internacionales N.º PCT/N02/00212 (publicada como WO03/034074) y PCT/NZ03/00059 (publicada como WO03087346). Las memorias descriptivas que acompañan a estas solicitudes se incorporan en el presente documento por referencia.

Las construcciones de molécula sintética vencen muchas de las limitaciones de uso de glucolípidos naturales en la práctica de estas invenciones. Una ventaja particular de las construcciones de molécula sintética es su rendimiento superior y capacidad de ser usadas en la transformación de células a temperaturas reducidas, por ejemplo, 4 ºC.

Como se describe en el presente documento, no todas las estructuras de espaciador (S_1-S_2) proporcionarán una construcción de molécula sintética (F-S_1-S_2-L) que sea soluble en agua y se incorpore espontáneamente y establemente en una bicapa lipídica tal como una membrana celular. Se determinó que las construcciones de molécula sintética designadas A_{tri}-sp-lípido (**IV**) y Atri-PAA-DOPE (V) no eran solubles en agua y/o incapaces de incorporarse espontáneamente y establemente en una bicapa lipídica tal como una membrana celular.



designada A_{tri}-sp-lípido (**IV**)



designada A_{tri}-PAA-DOPE (V) donde x, y = 0,05 a 0,2

La invención se ilustrará ahora por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes y figuras de los dibujos adjuntos en los que:

La **Figura 1** muestra resultados de Diamed de células almacenadas en Cellstab™ transformadas por solución de transformación de glucolípidos A naturales a (izquierda a derecha) 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml, 2 mg/ml* y 1 mg/ml. Los antisueros usados son Albaclone (arriba) y Bioclone (abajo). (*- la solución de transformación (que contiene glucolípidos) no se lavó después de la incubación, se dejó durante la noche y se lavó al día siguiente (día 2)).

La **Figura 2** muestra resultados de Diamed de células almacenadas en Cellstab™ transformadas por solución de transformación de glucolípidos B naturales a (izquierda a derecha) 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml, 2 mg/ml* y 1 mg/ml. Los antisueros usados son Albaclone (arriba) y Bioclone (abajo). (*- la solución de transformación (que contiene glucolípidos) no se lavó después de la incubación, se dejó durante la noche y se lavó al día siguiente (día 2)).

La **Figura 3** muestra análisis de FACS tras la transformación *in vitro* de glóbulos rojos humanos Le(a-b-) con glucolípido Le^b-6 natural con el tiempo a tres temperaturas de transformación, 37 ºC (arriba), 22 ºC (centro) y 4 ºC (abajo).

La **Figura 4** muestra resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) solución de transformación a (izquierda a derecha): lavadas 0,08 mg/ml; sin lavar 0,08 mg/ml; lavadas 0,05 mg/ml; sin lavar 0,05 mg/ml; lavadas 0,03 mg/ml; y sin lavar 0,03 mg/ml. El antisuero usado fue anti-A Bioclone.

La **Figura 5** muestra células que ya no se lavaron antes de la prueba. Los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) solución de transformación a (izquierda a derecha): 0,08 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0,03 mg/ml. El antisuero usado fue anti-A Bioclone.

La **Figura 6** muestra en la columna de la izquierda los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) solución de transformación a (izquierda a derecha): lavadas 0,6 mg/ml; sin lavar 0,6 mg/ml; lavadas 0,3 mg/ml; sin lavar 0,3 mg/ml; lavadas 0,15 mg/ml; y sin lavar 0,15 mg/ml; y en la columna derecha los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) solución de transformación a (izquierda a derecha): lavadas 0,08 mg/ml; sin lavar 0,08 mg/ml; lavadas 0,05 mg/ml; sin lavar 0,05 mg/ml; lavadas 0,03 mg/ml; y sin lavar 0,03 mg/ml. El antisuero usado fue anti-B Bioclone.

La **Figura 7** muestra células que ya no se lavaron antes de la prueba. Los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**) solución de transformación a (izquierda a derecha): 0,6 mg/ml, 0,3 mg/ml y 0,15 mg/ml.

La **Figura 8** muestra resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen lavadas A 0,07 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B. Los pocillos 3 y 4 contienen sin lavar A 0,07 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 9** muestra células que ya no se lavaron antes de la prueba. Los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen sin lavar A 0,07 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 10** muestra resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen lavadas A 0,07 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B. Los pocillos 3 y 4 contienen sin lavar A 0,07 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 11** muestra células que ya no se lavaron antes de la prueba. Los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen sin lavar A 0,07 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 12** muestra resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen lavadas A 0,06 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B. Los pocillos 3 y 4 contienen sin lavar A 0,06 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 13** muestra células que ya no se lavaron antes de la prueba. Los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen sin lavar A 0,06 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 14** muestra resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen lavadas A 0,06 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B. Los pocillos 3 y 4 contienen sin lavar A 0,06 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 15** muestra células que ya no se lavaron antes de la prueba. Los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen sin lavar A 0,06 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 16** muestra resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen lavadas A 0,05 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B. Los pocillos 3 y 4 contienen sin lavar A 0,05 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 17** muestra células que ya no se lavaron antes de la prueba. Los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen sin lavar A 0,05 + B 0,3 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 18** muestra resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen lavadas A 0,05 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B. Los pocillos 3 y 4 contienen sin lavar A 0,05 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B.

La **Figura 19** muestra células que ya no se lavaron antes de la prueba. Los resultados de Diamed de células transformadas a 4 ºC por transformación paralela con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**). Los pocillos 1 y 2 (izquierda a derecha) contienen sin lavar A 0,05 + B 0,2 mg/ml contra anti-A y anti-B.

Ejemplos comparativos

Los ejemplos comparativos no forman parte de la invención reivindicada. Los ejemplos comparativos describen la transformación de glóbulos rojos con glucolípidos naturales.

Ejemplo comparativo 1 - Preparación de glucolípidos naturales

Purificación por HPLC

En la primera etapa, se rellenaron columnas con sílice seca (15-25 µm) antes de cada serie. Podrían usarse muestras relativamente sucias en HPLC debido a que la sílice podría ser desechada junto con el nivel teóricamente alto de contaminantes irreversiblemente unidos.

Se separaron glucolípidos sobre gel de sílice con una fase móvil de polaridad creciente. El programa fue un gradiente lineal que empezó con 100 % de cloroformo-metanol-agua 80:20:1 (v/v) y que terminó con 100 % de cloroformo-metanol-agua 40:40:12 (v/v).

El equipo de HPLC usado fue un sistema Shimadzu capaz de bombear y mezclar cuatro disolventes separados a relaciones programadas. Como el cloroformo, metanol y agua se evaporan a diferentes tasas, se desarrolló un programa por el cual los componentes de disolvente no se mezclaron antes de entrar en la HPLC.

El Shimadzu HPLC mezcla cuatro líquidos diferentes tomando un "chupito" de cada uno de las cuatro botellas a la vez. "Chupitos" de cloroformo y agua directamente próximos entre sí en las líneas pueden producir problemas de miscibilidad. El metanol se intercaló entre estos dos componentes inmiscibles. Adicionalmente, el agua se pre-mezcló con metanol en una relación 1:1 para prevenir además problemas con la miscibilidad.

Ejemplo comparativo 2 - Transformación de la transformación de glóbulos rojos con glucolípidos naturales

Aglutinación

Se evaluó la transformación de glóbulos rojos por aglutinación usando el sistema de Diamed-ID Micro Typing, además de usando serología de tubo convencional. No se usaron las tarjetas de tipificación de Diamed ABO. Las tarjetas usadas fueron tarjetas de NaCl, prueba de enzimas y de aglutininas frías, que no se cargaron previamente con ningún antisuero u otros reactivos. Esto permitió el uso de antisueros específicos con ambas metodologías.

Tabla 1. Cargas de gel.

Fabricante	Ref de catálogo
Diamed	Tarjetas de NaCl, prueba de enzimas y de aglutininas frías

Se llevó a cabo un ensayo comparativo entre serología de tubo y el sistema Diamed para establecer el rendimiento de los dos sistemas. Las células se transformaron a 25 ºC durante 4 horas. Se usaron los antisueros A Seraclone y Alba-clone para calibrar la equivalencia. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 2. Antisueros usados en la comparación de serología de tubo con el sistema Diamed.

Fabricante	Ref de catálogo	Lote	Caducidad
Albaclone, SNBTS	Anti-A	Z0010770	12.12.04
Seraclone, Biotest	801320100	1310401	12.04.03

Tabla 3. Resultados de aglutinación que comparan la serología de tubo con el sistema Diamed.

		Glucolípido A (mg/ml)				
		10	5	2	1	0
Tubo	Albaclone	3+	2+	0	0	0
	Seraclone	3+	2+	0	0	0
Diamed	Albaclone	2+	2+	0	0	0
	Seraclone	3+	2+	1+	w+	0

En este experimento, el sistema Diamed demostró ser más sensible a las reacciones más débiles que la serología de tubo con anti-A Seraclone, pero no con Albaclone. Estos reactivos se formulan de manera diferente, y así no se espera que rindan de forma idéntica. Sin embargo, el hecho de que la combinación de serología de tubo de anti-A Seraclone no detectara la positividad es probablemente debido a la interpretación del operario. Las reacciones más débiles son notoriamente difíciles de puntuar con exactitud, y la diferencia entre 1+ y 0 puede ser difícil de discernir en tubos.

Optimización

Se examinaron las variables de concentración de glucolípido, temperatura de incubación, duración de la incubación, diluyente y solución de almacenamiento para su efecto sobre la salud de la célula. Se evaluó la eficiencia y estabilidad de la transformación por aglutinación con el anticuerpo relevante.

Tabla 4. Aglutinación de serología de tubo de células transformadas con glucolípido A natural con respecto a diferentes tiempos y temperaturas.

	A								
	10	5	2	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0
Seraclone (37 ºC durante 1,5 horas)	3+	2+	0	0					0
Seraclone (25 ºC durante 4 horas)	4+	3+	2+	1+	w+	0	0	0	0

Concentración de glucolípido

Se llevaron a cabo experimentos de transformación inicial con una muestra de glucolípido Le^b altamente purificada (HPLC) y una muestra de glucolípido A de grupo sanguíneo menos pura. La transformación se realizó a 37 ºC durante 1,5 horas

La muestra de glucolípido A contuvo otras impurezas de lípido y así comparativamente menos moléculas de grupo sanguíneo A en peso que la muestra de glucolípido Le^b de concentración equivalente (peso/volumen). Esto parece ser confirmado por el hecho de que se requirieron mayores concentraciones del glucolípido A que del glucolípido Le^b para producir puntuaciones de aglutinación equivalentes (véase la Tabla 6).

El nivel de impureza en la muestra de glucolípido A también puede haber contribuido a la estabilidad más baja durante el periodo de 62 días - las células transformadas con A 'murieron' a la concentración más alta (que ha recibido la dosis más grande de impureza).

Tabla 5. Anti-A y anti-Le^b usados en la prueba inicial de transformación de glucolípidos naturales.

Fabricante	Ref de catálogo	Número de lote	Caducidad
Anti-A Seraclone, Biotest	801320100	1310401	12.04.03
Anti-Le^b CSL		12801	

Tabla 6. Estabilidad de RBC transformados con glucolípido A natural y Le^b como se evalúa por la aglutinación de serología de tubo durante el periodo de 62 días.

Glucolípido (mg/ml)	Le^b			A		
	Día 1	Día 25	Día 62	Día 1	Día 25	Día 62
10	4+		2-3+	3+	2+	?
5	4+		2-3+	2+	2+	w+
2	3+		1-2+	0	1+	0
1	4+		2+	0	1+	0

Glucolípido (mg/ml)	Le^b			A		
	Día 1	Día 25	Día 62	Día 1	Día 25	Día 62
0,1	3+	2+	0	0		
0,01	2+	2+	0	0		
0,001	2+	2+	0	0		
0,0001	2+	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0

Las células anteriores también se clasificaron para hemólisis y estos resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7. Hemólisis como se evalúa visualmente. Día 1 - en el sobrenadante del primer lavado después de la transformación; Días 25 y 62 - en la solución de conservante celular antes de que las células se resuspendan después del almacenamiento. La escala de puntuación es análoga a la escala de aglutinación de 4+ a 0: hhhh – gravemente hemolizado, hhh – muy hemolizado, hh – moderadamente hemolizado, h – levemente hemolizado, w – ligeramente hemolizado y 0 – no se observa hemólisis.

Concentración de glucolípido (mg/ml)	Hemólisis L_e^b			A		
	Día 1	Día 25	Día 62	Día 1	Día 25	Día 62
10	h	0	h	h	h	muertos
5	hh	0	hhh	w	0	hh
2	w	0	hhh	w	0	hhhhh
1	w	0	hhh	h	0	hhhh
0,1			h			hhh
0,01			hh			
0,001			h			
0,0001			h			
Control	h	0	h	h	h	

Estos resultados muestran que las hemólisis celular puede mostrar que se asocia a transformación con altas concentraciones de glucolípido. No está claro si el mecanismo subyacente a esta alteración de la membrana plasmática es o no por grandes cantidades de glucolípido que se insertan, la tasa de esa inserción, o es posiblemente debido a la cantidad de impureza asociada. Sin embargo, los resultados para Le^b en el día 62 parecen apoyar la primera explicación.

La muestra de Le^b se purificó altamente - antes de disolverse, era un polvo de color blanco puro, y así es poco probable que la hemólisis fuera debida al efecto perjudicial de las impurezas. Es evidente ver que a los 62 días la cantidad de hemólisis que se produjo disminuyó en línea con la disminución en la concentración de glucolípido.

Temperatura de incubación

Se llevaron a cabo experimentos para investigar otros posibles mecanismos para la reducción de la hemólisis de RBC durante la etapa de inserción. Experimentos previos habían mostrado que la hemólisis era peor a concentraciones de glucolípido más altas que a concentraciones más bajas, y se cree que la hemólisis también puede relacionarse con la tasa de inserción de glucolípido. Como se cree que la temperatura afecta la tasa de inserción, se realizaron experimentos que comparaban la transformación a 37 ºC con la transformación a temperatura ambiente (TA; 25 ºC).

Como se esperaba que la tasa se ralentizara a medida que disminuía la temperatura, el periodo de incubación para el experimento de TA fue 4 h. Se evaluó la hemólisis visualmente y se puntuó tras la inserción. También se realizaron pruebas de serología en las células. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. El efecto de la temperatura de incubación sobre la hemólisis y aglutinación durante la inserción de glucolípidos en membranas de RBC. La hemólisis se puntuó visualmente en cada uno de los tres lavados.

Glucolípido (mg/ml)	Hemólisis						Serología	
	TA			37 ºC			TA	37 ºC
	lavado 1	lavado 2	lavado 3	lavado 1	lavado 2	Lavado 3		
10	w	0	0	hh	w	0	2+	2+
1	w	0	0	hh	h	vw	1+	w+

Duración de la incubación

Se llevó a cabo incubación a 37 ºC durante 1 y 2 horas y se evaluó su efecto sobre la salud de la célula y la transformación por aglutinación con el anticuerpo relevante.

Tabla 9. Antisueros usados en la duración del ensayo de incubación.

Fabricante	Ref de catálogo	Número de lote	Fecha de caducidad
Albaclone, SNBTS	Anti-A	Z0010770	12.12.04
Bioclone, OCD	Anti-A, reactivo experimental	DEV01102	-
Albaclone, SNBTS	Anti-B	Z0110670	01.07.05
Bioclone, OCD	Anti-B, reactivo experimental	DEV01103	-

Tabla 10. Efecto del tiempo de incubación sobre la aglutinación de células transformadas con glucolípidos naturales.

Glucolípido	Concentración (mg/ml)	Albaclone		BioClone	
		1 hora	2 horas	1 hora	2 horas
A	10	4+	4+	4+	4+
	5	4+	4+	4+	2+
	2	4+	3+	3+	2+
	1	3+	2+	2+	2+
	0,5	2+	2+	1+	w+
B	10	3+	2+	4+	1+
	5	3+	2+	3+	2+
	2	2+	2+	2+	1+
	1	1+	w+	1+	w+
	0,5	1+	w+	w+	w+

Estos resultados indican que aumentar la duración de la incubación durante la inserción de glucolípidos naturales no potencia la aglutinación. En realidad, las puntuaciones de aglutinación se reducen después de la incubación de dos horas. Esto puede ser debido a la desestabilización de la membrana o intercambio de glucolípidos de nuevo en solución.

Diluyente

También se llevaron a cabo experimentos para determinar si el cambiar la solución de diluyente de glucolípidos podría reducir la hemólisis. Se comparó PBS de concentración de trabajo con 2 x PBS y 2 % de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS de concentración de trabajo. Las células se incubaron a 37 ºC durante 1,5 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Estudio sobre el efecto sobre la hemólisis de cambiar las soluciones de diluyente de glucolípidos durante la inserción de glucolípidos en membranas de RBC.

Concentración de glucolípido (mg/ml)	Solución de diluyente de glucolípidos		
	PBS	2xPBS	2 % BSA en PBS
40	hhh	hhh	hhh
30	hhh	hhh	hhh
20	hhh	hhh	hhh
10	hhh	hhh	hhh
0	0	0	0

Estabilidad

Una vez se habían purificado por HPLC los glucolípidos de grupos sanguíneos A y B a un nivel aceptable, se llevó a cabo un experimento para encontrar las concentraciones apropiadas para ensayos de estabilidad.

Tabla 12. Ensayo de estabilidad temprano de células transformadas con glucolípido A natural.

Expt	Día	A								
		10	5	2	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0
1	7	4+	3-4+	1+	0	0	0	0	0	0
2	43	3+	w+	0	0	0	0	0	0	0
3	50	1+	0	0	0					
4	60	3+	1+	0						
5	67	w+	vw	vw						
6	74	2+	0	0						
7	81	2+	1+	0						

Tabla 13. Antisueros usados en los ensayos de estabilidad (Tabla 14 y Tabla 15).

Fabricante	Ref de catálogo	Número de lote	Fecha de caducidad
Albaclone, SNBTS	Anti-A	Z0010770	12.12.04
Bioclone, OCD	Anti-A, reactivo experimental	DEV01102	-
Albaclone, SNBTS	Anti-B	Z0110670	01.07.05
Bioclone, OCD	Anti-B, reactivo experimental	DEV01103	-

Tabla 14. Serología de tubo de RBC O transformados con glucolípido A con el fin de establecer concentraciones apropiadas para ensayos de estabilidad.

Anti-A	Expt	Glucolípido A (mg/ml)								
		10	5	2	1	0,5	0,1	0,01	0,001	0
Alba	1	3+	2+	1+	0		0	0	0	0
	2	4+	4+	3+	2+	w+				
Bio	1	3+	2+	1+	0		0	0	0	0
	2	4+	4+	3+	2+	w+				

Transformación 1 y 2 a 25 ºC durante 4 horas

Tabla 15. Serología de tubo de RBC O transformados con glucolípido B con el fin de establecer concentraciones apropiadas para ensayos de estabilidad.

Anti-B	Expt	Glucolípido B (mg/ml)								
		10	5	2	1	0,5	0,1	0,01	0,001	0
Alba	1	2+	1+	w+	0		0	0	0	0
	2	1+	1+	w+	0	w+				
Bio	1	3+	2+	w+	0		0	0	0	0
	2	1+	1+	w+	0	w+				

Transformación 1 y 2 a 25 ºC durante 4 horas

Se transformaron dos conjuntos de células con diferentes concentraciones de glucolípido A natural. La transformación se realizó a 25 ºC. Se probó un conjunto de células a largo plazo, y se probó un conjunto de células semanalmente para aglutinación. Los resultados aglutinación de la serología de tubo y Diamed se muestran en la Tabla 16 a continuación. Todas las células se almacenaron en Cellstab™ en botellas con bases planas. Las células mostraron de hemólisis mínima a ninguna en todo momento.

Tabla 16. Resultados de aglutinación para células transformadas con diferentes concentraciones de glucolípido A natural. Los resultados se obtuvieron usando anti-A Albaclone.

		Glucolípido A (mg/ml)					
		10	5	2	1	0,1	control
Prueba a largo plazo							
Día 1	Tubo	4+	3+	2+	1+	+w	0
	Diamed	3+	3+	+w	0	0	0
Día 17	Tubo	3+	2+	0	0		0
	Diamed	3+	2+	1+	0		0
Prueba semanal							
Día 1	Tubo	3+		2+		0	0
	Diamed	3+		0		0	0
Día 8	Tubo	1+		0		0	0
	Diamed	3+		0		0	0
Día 15	Tubo	1+		0		0	0
	Diamed	3+		2+		0	0
Día 22	Tubo	3+		0		0	0
	Diamed	3+		0		0	0
Día 29	Tubo	*+w		*0		*0	*0
	Diamed	*3+		*0		*0	*0
Día 36	Tubo	*		*		*	*0
	Diamed	*3+		*0		*0	*0
Día 43	Tubo	*		*		*	*0
	Diamed	*		*		*	*0

*-Albaclone, mientras que todos los otros usados anti-A Seraclone.

Solución de almacenamiento

Se llevó a cabo la comparación de las dos soluciones de almacenamiento de células, Celpresol™ (CSL) y Cellstab™ (Diamed), para probar sus capacidades relativas para soportar a los RBC modificados.

Se ensayó la estabilidad de RBC transformados con soluciones de antígeno de grupo sanguíneo A y B de concentraciones variables cuando se guardaron en dos soluciones de conservante celular diferentes - Cellstab™ y Alsevers™.

Se usaron antisueros A y B de dos fuentes diferentes en las pruebas de serología.

Todas las células se probaron usando la plataforma de serología de tubo estándar hasta 42 días, momento en el que las reacciones de aglutinación de células habían sido demasiado difíciles de puntuar manualmente (véase la Tabla 17 para resultados de A y la Tabla 18 para resultados de B).

Se llevó a cabo la prueba de tarjetas de gel de Diamed hasta el día 56 para las células guardadas Alsevers, y se interrumpió en el día 63 debido a contaminación fúngica (aunque todavía devolviendo puntuaciones positivas).

Las células guardadas Cellstab™ continuaron probándose hasta el día 70, y todavía fueron viables en este momento (véase la Figura 1 para resultados de A y la Figura 2 para resultados de B).

Los reactivos usados en el ensayo de estabilidad se muestran en la Tabla 13.

Tabla 17. Resultados de serología de tubo del ensayo de estabilidad de células transformadas con concentraciones variables de glucolípido A y guardadas en o bien Cellstab™ o bien Alsevers™

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-A Albaclone (SNBTS) Solución de transformación (mg/ml)					Anti-A Bioclone (OCD - reactivo de desarrollo)				
		10	5	2	2*	1	10	5	2	2*	1
2	Alsevers	4+	3+	2+	1+	w+	3+	3+	1+	1+	0
	Cellstab™	4+	4+	3+	1+	1+	3+	3+	2+	1+	0
8	Alsevers	4+	4+	2+	1+	1+	2+	2+	1+	1+	0
	Cellstab™	4+	4+	3+	2+	1+	3+	3+	2+	w+	0
14	Alsevers	4+	3+	2+	2+	w+	2+	1+	w+	vw	0
	Cellstab™	4+	3+	3+	2+	w+	3+	2+	w+	vw	0
21	Alsevers	3+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	0
	Cellstab™	3+	3+	2+	+	‡	2+	‡	‡	‡	0
28	Alsevers	2+	2+	1+	1+	0	2+	2+	1+	1+	0
	Cellstab™	2+‡	2+‡	‡	‡	0	1+	w+	0	0	0
36	Alsevers	3+	2+	2+	2+	1+	3+	3+	2+	1+	1+
	Cellstab™	3+‡	2+‡	‡	‡	‡	3+‡	‡	‡	‡	‡
42	Alsevers	3+	3+	1+	w+	0	2+	2+	2+	1+	1+
	Cellstab™	4+‡	4+‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	0

*- la solución de transformación (que contiene glucolípidos) no se lavó después de la incubación, se dejó durante la noche y se lavó al día siguiente.
‡- botón de células positivas, pero las células caen como negativas (asignación de puntuación imposible).

Tabla 18. Resultados de serología de tubo del ensayo de estabilidad de células transformadas con concentraciones variables de glucolípido B y guardadas en cualquiera de Cellstab™ o Alsevers™.

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-B Albaclone (SNBTS) Solución de transformación (mg/ml)					Anti-B Bioclone (OCD - reactivo de desarrollo)				
		10	5	2	2*	1	10	5	2	2*	1
2	Alsevers	3+	3+	1+	1+	1+	2+	1+	1+	1+	0
	Cellstab™	3+	3+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	w+
8	Alsevers	1+	1+	w+	0	0	0	0	0	0	0
	Cellstab™	2+	1+		w+	0	1+	1+	w+	0	0
14	Alsevers	2+	2+	0	w+	0	0	1+	1+	2+	0
	Cellstab™	1+	w+	0	0	0	2+	2+	w+	1+	1+
21	Alsevers	‡	‡	‡	‡	‡	1	1	‡	‡	‡
	Cellstab™	‡	‡	‡	‡	‡	+	+	+	‡	‡
28	Alsevers	2+	1+	w+	0	0	2+	1+	2+	0	0
	Cellstab™	‡	t	‡	0	0	‡	0	‡	‡	0
36	Alsevers	2+	2+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	1+	1+
	Cellstab™	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡
42	Alsevers	2+	2+	2+	2+	w+	2+	2+	1+	w+	w+
	Cellstab™	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡

*- solución de transformación (que contiene glucolípidos) no se lavó después de la incubación, se dejó en durante la noche y se lavó al día siguiente.
‡- botón de células positivas, pero las células caen como negativas (asignación de puntuación imposible).

Análisis de FACS de inserción de glucolípidos

Se realizó la transformación de glóbulos rojos humanos Le(a-b-) con glucolípido Le^b-6 natural con el tiempo a tres

temperaturas de transformación (37 ºC, 22 ºC y 4 ºC) (Figura 3). El glucolípido Le^b-6 natural se disolvió en plasma y se usó para transformar RBC a una concentración final de 2 mg/ml y una suspensión final del 10 %.

Se determinó la reactividad por análisis de FACS usando un Gamma anti-Leb. (El nivel de detección serológica es aproximadamente 10^2 moléculas. La inserción de glucolípidos naturales a 4 ºC durante 8 horas no fue detectable por aglutinación con anticuerpos.) La proyección de la curva de la tasa de inserción del análisis de FACS no indicó que la tasa de inserción a 4 ºC hubiera alcanzado los niveles de detección de aglutinación en el plazo de 24 horas.

Temperatura de baja incubación

Se realizó transformación de RBC con glucolípido A o B natural a 37 ºC durante 1 hora y 2 ºC durante intervalos variables. Las células se aglutinaron con anti-A Bioclone o anti-B Bioclone. Los resultados se proporcionan en las Tablas 19 y 20.

Tabla 19. Resultados de Diamed de comparación de la transformación de glucolípido A natural a 37 ºC durante 1 hora y 2 ºC durante intervalos variables.

Temp	Tiempo (horas)	A nat (mg/ml)				
		10	5	2	1	0
37 ºC	1	3+	3+	2-3+	2+	0
2 ºC	1	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	8	1-2+	0	0	0	0
	24	2-3+	2+	1-2+	0	0
	48	3+	2-3+	2-3+	0	0
	72	3-4+	3+	2+	0	0

Tabla 20. Los resultados de Diamed de comparación de la transformación de glucolípido B natural a 37 ºC durante 1 hora y 2 ºC durante intervalos variables.

Temp	Tiempo (horas)	B nat (mg/ml)				
		10	5	2	1	0
37 ºC	1	3+	2-3+	2+	0	0
2 ºC	1	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
	24	1+	0	0	0	0
	48	2+	1-2+	0	0	0
	72	2+	1+	0	0	0

La tasa de transformación es lenta para tanto el glucolípido A natural como el glucolípido B natural como se demuestra por las puntuaciones de aglutinación negativas después de 1 hora a 2 ºC. Se ha demostrado inserción considerable a 37 ºC para este intervalo de tiempo.

La inserción del glucolípido A natural a 2 ºC requirió 48 horas para alcanzar el mismo nivel de inserción obtenible por la transformación a 37 ºC. Después de este tiempo no se observó inserción adicional. Asimismo, la inserción de glucolípido B natural a 2 ºC no fue tan rápida como la transformación a 37 ºC. Las puntuaciones de aglutinación no mejoraron tras la incubación continuada y así se consideró que habían alcanzado la máxima inserción en este momento para estas concentraciones.

EJEMPLOS

Los ejemplos describen la transformación de glóbulos rojos con las construcciones de molécula sintética de la invención. En el contexto de estos ejemplos, el término "glucolípidos sintéticos" se usa para referirse a estas construcciones.

Ejemplo 1 - Preparación de glucolípidos sintéticos

Materiales y métodos

Se realizó el análisis de CCF sobre placas de gel de sílice 60 F_{254} (Merck), los compuestos se detectaron por tinción con 8 % de ácido fosfórico en agua, seguido de calentamiento a más de 200 ºC. Se llevó a cabo cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 (0,2-0,063 mm, Merck) o Sephadex LH-20 (Amersham). Los espectros de RMN ^1H se adquirieron en un espectrómetro Bruker DRX-500. Los desplazamientos químicos se dan en ppm (δ) con respecto a CD_3OD.

Síntesis de 1,2-O-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) y 1,2-O-diestereoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DSPE) (glicerofosfolípidos) activadas

A una solución de adipato de *bis*(N-hidroxisuccinimidilo) (A) (70 mg, 205 µmoles) en N,N-dimetilformamida seca (1,5 ml) se añadieron DOPE o DSPE (L) (40 µmoles) en cloroformo (1,5 ml), seguido de trietilamina (7 µl). La mezcla se mantuvo durante 2 h a temperatura ambiente, entonces se neutralizó con ácido acético y se concentró parcialmente a vacío.

La cromatografía en columna (Sephadex LH-20, 1:1 de cloroformo-metanol, 0,2 % de ácido acético) del residuo dio el lípido activado (A-L) (37 mg, 95 %) como un jarabe incoloro; CCF (cloroformo-metanol-agua, 6:3:0,5): R_f = 0,5 (DOPE-A), R_f = 0,55 (DSPE-A).

RMN ^{1}H ($CDCl_3/CD_3OD$, 2:1), δ:

DOPE-A - 5,5 (m, 4H, 2×(-CH=CH-), 5,39 (m, 1H, $-OCH_2-CHO-CH_2O-$), 4,58 (dd, 1H, J=3,67, J=11,98, -CCOOHCH-CHO-CH_2O-), 4,34 (dd, 1H, J=6,61, J=11,98, -CCOOHCH-CHO-CH_2O-), 4,26 (m, 2H, PO-CH_2-CH_2-NH_2), 4,18 (m, 2H, -CH_2-OP), 3,62 (m, 2H, PO-CH_2-CH_2-NH_2), 3,00 (s, 4H, ONSuc), 2,8 (m, 2H, -CH_2-CO (Ad), 2,50 (m, 4H, 2×(-CH_2-CO), 2,42 (m, 2H, -CH_2-CO (Ad), 2,17 (m, 8H, 2×(-CH_2-CH=CH-CH_2-)= 1,93 (m, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 1,78 (m, 4H, 2×($COCH_2CH_2$-), 1,43, 1,47 (2 s a, 40H, 20 CH_2), 1,04 (m, 6H, 2 CH_3).

DSPE-A - 5,39 (m, 1H, $-OCH_2-CHO-CH_2O-$), 4,53 (dd, 1 H, J=3,42, J=11,98, -CCOOHCH-CHO-CH_2O-), 4,33 (dd, 1 H, J=6,87, J=11,98, -CCOOHCH-CHO-CH_2O-), 4,23 (m, 2H, PO-CH_2-CH_2-NH_2), 4,15 (m, 2H, -CH_2-OP), 3,61 (m, 2H, PO-CH_2-CH_2-NH_2), 3,00 (s, 4H, ONSuc), 2,81 (m, 2H, -CN_2-CO (Ad), 2,48 (m, 4H, 2×(-CH_2-CO), 2,42 (m, 2H, -CH_2-CO (Ad), 1,93 (m, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 1,78 (m, 4H, 2×($COCH_2CH_2$-), 1,43, 1,47 (2 s a, 40H, 20 CH_2), 1,04 (m, 6H, 2 CH_3).

Condensación de DOPE activado (o DSPE) con aminopropilglucósido.

A una solución de DOPE activado (o DSPE) (A-L) (33 µmoles) en N,N-dimetilformamida (1 ml) se añadieron 30 µmoles de Sug-S_1-NH_2 (F-S_1-NH_2) y 5 µl de trietilamina. Por ejemplo, Sug puede ser cualquiera del aminopropilglucósido (F-S_1-NH_2) de cualquier trisacárido GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ (A-glucotope) (F) o trisacárido Galα1-3(Fucα1-2)Galβ (B-glucotope) (F).

La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La cromatografía en columna (Sephadex LH-20 en 1:1 de cloroformo-metanol seguido de gel de sílice en acetato de etilo-isopropanol-agua, 4:3:1 (v/v/v) de la mezcla normalmente dio 85-90 % de la construcción de molécula sintética, por ejemplo, A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) o B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**).

RMN ^{1}H ($CDCl_3/CD_3OD$, 1:1), δ:

A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) - 5,5 (m, 4H, 2×(-CH=CH-), 5,43-5,37 (m, 2H, H-1 (GalNHAc) y $-OCH_2-CHO-CH_2O-$), 5,32 (d, 1H, H-1, J=3,5 H-1 Fuc), 2,50 (m, 4H, 2×(-CH_2=CO), 2,40 (m, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 2,20 (m, 8H, 2×(-CH_2-CH=CH-CH_2-), 2,1 (s, 3H, NHAc), 1,92 (m, 2H, O-$CH_2CH_2CH_2$-NH), 1,8 (m, 8H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$ y 2×($COCH_2CH_2$-), 1,43, 1,47 (2 s a, 40H, 20 CH_2), 1,40 (d, 3H, J= 6,6, CH_3 Fuc), 1,05 (m, 6H, 2 CH_3).

A_{tri}-spsp_1-Ad-DOPE (**II**) - 5,5 (m, 4H, 2×(-CH=CH-), 5,43-5,37 [m, 2H, H-1 (GalNHAc) y - $OCH_2-CHO-CH_2O$-], 5,32 (d, 1H, H-1, J=3,6 H-1 Fuc), 2,50 (m, 4H, 2×(-CH_2-CO), 2,40- 2,32 (m, 6H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$ y $COCH_2$- (sp_1), 2,18 [m, 8H, 2×(-CH_2-CH=CH-CH_2-)], 2,1 (s, 3H, NHAc), 1,95(m, 2H, O-$CH_2CH_2CH_2$-NH), 1,8 [m, 10H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$, 2×($COCH_2CH_2$-...), -$COCH_2CH_2$, $(CH_2)_3NH$-], 1,68 (m, 2H, $CO(CH_2)_3CH_2CH_2NH$-), 1,43, 1,47 (2 s a, 42H, 22 CH_2), 1,37 (d, 3H, J=5,6, CH_3 Fuc), 1,05 (m, 6H, 2 CH_3).

A_{tri}-sp-Ad-DSPE (**III**) - 5,42-5,38 (m, 2H, H-1 (GalNHAc) y $-OCH_2-CHO-CH_2O-$), 5,31 (d, 1H, H-1, J=3,5 H-1 Fuc), 2,48 [m, 4H, 2×(-CH_2-CO)], 2,42 (m, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 2,18 (s, 3H, NHAc), 1,95 (m, 2H, O-$CH_2CH_2CH_2$-NH), 1,8 [m, 8H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$ y 2×($COCH_2CH_2$-)], 1,43, 1,47 (2 s a, 56H, 28 CH_2), 1,38 (d, 3H, J=6,6, CH_3 Fuc), 1,05 (m, 6H, 2 CH_3).

B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**) - 5,5 (m, 4H, 2×(-CH=CH-), 5,42-5,38 [m, 2H, H-1 (Gal) y $-OCH_2-CHO-CH_2O$-], 5,31 (d, 1H, H-1, J=3,7, H-1 Fuc), 2,48 [m, 4H, 2×(-CH_2-CO)], 2,39 (m, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 2,18 [m, 8H, 2×(-CH_2-CH=CH-CH_2-)], 1,93 (m, 2H, O-$CH_2CH_2CH_2$-NH), 1,8 [m, 8H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$ y 2×($COCH_2CH_2$-)], 1,43, 1,47 (2 s a, 40H, 20 CH_2), 1,36 (d, 3H, J=6,6, CH_3 Fuc), 1,05 (m, 6H, 2 CH_3).

H_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VII**) - 5,5 [m, 4H, 2×(-CH=CH-)], 5,4 (m, 1H, $-OCH_2-CHO-CH_2O-$), 5,35 (d, 1H, H-1, J=3,2, H-1 Fuc), 4,65, 4,54 (2d, J=7,4, J=8,6, H-1 Gal, H-1 GlcNHAc), 4,46 (dd, 1H J=3,18, J=12, -CCOOHCH-CHO-CH_2O-), 4,38-4,28 (m, 2H, H-5 Fuc, CCOOHCH-CHO-CH_2O-), 2,48 [m, 4H, 2×(-CH_2-CO)], 2,40 (m, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 2,18 [m, 8H, 2×(-CH_2-CH=CH-CH_2-)], 2,08 (s, 3H,NHAc), 1,92 (m, 2H, O-$CH_2CH_2CH_2$-NH), 1,82-1,72 [m, 8H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$ y 2×($COCH_2CH_2$-)], 1,48, 1,45 (2 s a, 40H, 20 CH_2), 1,39 (d, 3H,

J=6,5, CH_3 Fuc), 1,05 (m, 6H, 2 CH_3).

H_{di}-sp-Ad-DOPE (**VIII**) - 5,49 (m, 4H, 2×(-CH=CH-), 5,37 (m, 1H, -OCH_2-CHO-CH_2O-), 5,24 (d, 1H, H-1, J=2,95, H-1 Fuc), 4,46 (d, J=7,34, H-1 Gal), 2,48 [m, 4H, 2×(-CH_2-CO)], 2,42-2,35 (m, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 2,17 [m, 8H, 2×(-CH_2-CH=CH-CH_2-)], 1,95 (m, 2H, O-$CH_2CH_2CH_2$-NH), 1,81-1,74 [m, 8H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$ y 2×($COCH_2CH_2$-)], 1,45, 1,41 (2 s a, 40H, 20 CH_2), 1,39 (d, 3H, J=6,5, CH_3 Fuc), 1,03 (m, 6H, 2 CH_3).

Galβ-sp-Ad-DOPE (**IX**) - 5,51 [m, 4H, 2×(-CH=CH-)], 5,4 (m, 1 H, -OCH_2-CHO-CH_2O-), 4,61 (dd, 1H J=3,18, J=12, -CCOOHCH-CHO-CH_2O-), 4,41 (d, J=7,8, H-1 Gal), 4,37 (dd, 1H, J=6,6, J=12, -CCOOHCH-CHO-CH_2O-), 2,50 [m, 4H, 2×(-CH_2-CO)], 2,40 (m, 4H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 2,20 [m, 8H, 2×(-CH_2-CH=CH-CH_2-)], 1,97 (m, 2H, O-CH_2CH_2CH2-NH), 1,82-1,72 [m, 8H, $COCH_2CH_2CH_2CH_2CO$ y 2×($COCH_2CH_2$-)], 1,48, 1,45 (2 s a, 40H, 20 CH_2), 1,05 (m, 6H, 2 CH_3).

Ejemplo 2 - Solubilidad de glucolípidos sintéticos

Para su uso en la transformación de células, el primer criterio que los glucolípidos sintéticos pueden cumplir es que sean solubles en disolventes acuosos, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. Se emplearon inicialmente varias técnicas, que incluyen calor y/o sonicación, con el fin de maximizar la solubilidad de los glucolípidos sintéticos probados (Tabla 21).

El glucolípido sintético debe también ser capaz de insertarse en la membrana y ser reconocible por el anticuerpo apropiado para la transformación que va a detectarse por aglutinación. Pruebas iniciales en las moléculas fueron para establecer la solubilidad y así eliminar aquellas moléculas que no fueran adecuadas para su uso en la transformación de células.

Los resultados de estas pruebas iniciales se proporcionan en la Tabla 22.

Tabla 21. El intervalo de moléculas de glucolípido sintético probadas.

Colas lipídicas de DOPE:
B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**)
A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)**
Galβ-sp-Ad-DOPE **(IX)**
H_{di}-sp-Ad-DOPE **(VIII)**
H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**
A_{tri}-spsp1-Ad-DOPE **(II)**
Btri-PAA-DOPE **(V)**
Diferentes colas lipídicas:
A_{tri}-Sp-lípido **(IV)**
A_{tri}-sp-Ad-DSPE **(III)**

Tabla 22. Solubilidad de glucolípidos sintéticos en PBS caliente y capacidad de transformación.

Sintético	Solubilidad en agua	Capacidad de transformación detectable
A_{tri}-Sp-lípido **(IV)**	No	No
B_{tri}-PAA-DOPE **(V)**	No	No
B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)**	Sí	Sí
A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)**	Sí	Sí
Galβ-sp-Ad-DOPE **(IX)**	Sí	No
H_{di}-sp-Ad-DOPE **(VIII)**	Sí	No
H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**	Sí	Sí
A_{tri}-$spsp_1$-Ad-DOPE **(II)**	Sí	Sí
A_{tri}-sp-Ad-DSPE **(III)**	Sí	Sí

Se creyó que la falta de transformación detectable por Galβ-sp-Ad-DOPE **(IX)** y H_{di}-sp-Ad-DOPE **(VIII)** era debida a la incapacidad del anticuerpo para reconocer el glucotope de estas moléculas sintéticas. A_{tri}-sp-lípido **(IV)** tiene una cola individual en vez de una de diacilo y se propuso que no hubo inserción de esta molécula sintética en la membrana bicapa.

Ejemplo 3 - Transformación a baja temperatura de RBC por glucolípidos sintéticos A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI)

Los RBC están más sanos cuando se almacenan a 4 ºC, y asimismo se cree que están más sanos cuando se transforman a 4 ºC. No se creyó que se produjera una tasa significativa de inserción de los glucolípidos sintéticos a 4 ºC debido a los estudios previos de los presentes inventores (véanse los Ejemplos comparativos) y estudios por otros (Schwarzmann, 2000). Estos estudios se realizaron con glucolípidos naturales. Sorprendentemente, estos

estudios no predijeron el comportamiento de los glucolípidos sintéticos de la invención.

Aunque no se desee quedar ligado a teoría, en los estudios de Schwarzmann la baja tasa de inserción de los glucolípidos naturales pueden ser debida a las propiedades fisicoquímicas de la cola de glucolípido natural; un esfingolípido y un ácido graso.

La cola de diacilo del glucolípido puede ser importante en la determinación de la tasa de inserción. Ciertas colas de diacilo pueden retener mayor fluidez a temperaturas más bajas. Alternativamente, el dominio de la membrana plasmática en la que se inserta la cola de diacilo de estos glucolípidos puede retener esta mayor fluidez.

Se sabe que las colas de esfingolípido de glucolípidos naturales se congregan en dominios rígidos y estos dominios pueden no permitir la incorporación adicional de glucolípido a bajas temperaturas. Glucolípidos sintéticos con colas de diacilo *cis*-desaturadas pueden ser favorecidas para su uso.

Primero se evaluó la transformación de RBC con glucolípidos sintéticos con diferentes colas lipídicas (Tablas 22 y 24).

Tabla 23. Antisueros usados para obtener los resultados presentados en las Tablas 24 a 27.

Anti-A			
Fabricante	Ref de catálogo	Número de lote	Fecha de caducidad
Albaclone, SNBTS		Z0010770	12.12.04
BioClone, OCD	Reactivo experimental	01102	-
Anti-B			
Fabricante	Ref de catálogo	Número de lote	Fecha de caducidad
Albaclone, SNBTS		Z0110600	27.04.03
BioClone, OCD	Reactivo experimental	01103	-

Tabla 24. Evaluación de la inserción de diferentes colas lipídicas por aglutinación con los antisueros relevantes.

Molécula	Antisuero	Solución de transformación (µg/ml)										
		1000	500	250	125	100	60	50	40	30	20	10
A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I)	Alba							w+	w+	0	0	0
	Bio							2+	1+	w+	0	0
	Alba			4+		3+		2-3+				2+
	Bio			4+*		4+*		3+*				3+
	DBA	0										
B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI)	Alba	3+										
	Bio	3+										
	Alba	2+	2+	1+	0		0					
	Bio	3+	2+	1+	0		0					
A_{tri}-spsp_1-Ad-DOPE (II)	Alba							0	0	0	0	0
	Bio							0	0	0	0	0
	Alba			4+		3+		2+				2+
	Bio			4+*		3-4+*		3+*				2+
	DBA	0										
A_{tri}-sp-lípido (IV)	Alba	0										
	Bio	0										
A_{tri}-sp-Ad-DSPE (III)	Alba							0	0	0	0	0
	Bio							0	0	0	0	0
	Alba			2-3+		2-3+		2+				2+
	Bio			3+		2-3+		2+				2+
	DBA	0										

* - salpican.

Entonces se evaluó la transformación de RBC con los glucolípidos sintéticos A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) a 4 ºC (Tablas 25 a 28). Estas transformaciones se dirigieron hacia la preparación de células que expresan bajos niveles de glucotopes A, B o A y B ("células A, B y AB débiles").

Para la preparación de células A y B débiles, se mezclaron soluciones de transformación (20 µl, A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** a 0,08, 0,05 y 0,03 mg/ml, y B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,6, 0,3, 0,15, 0,08, 0,05 y 0,03 mg/ml) en 1 x PBS con concentrado de RBC del grupo O lavado (60 µl).

Para la preparación de células AB débiles, se combinaron soluciones de transformación (20 µl, A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** a 0,07, 0,06 y 0,05 mg/ml, y B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,3, y 0,2 mg/ml) en 1 x PBS en título de bloqueo con concentrado de RBC del grupo O lavado (60 µl). Las combinaciones fueron: A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a 0,07 mg/ml + B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,3 mg/ml; A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** a 0,07 mg/ml + B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,2 mg/ml; A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** a 0,06 mg/ml + B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,3 mg/ml; A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a 0,06 mg/ml + B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,2 mg/ml; A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(1)** a 0,05 mg/ml + B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,3 mg/ml; y A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** 0,05 + B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** 0,2 mg/ml.

Se dispusieron las células y soluciones de transformación en un frigorífico a 4 ºC. Se realizó mezcla con pipeta a intervalos. Las células se sacaron para probar a intervalos contra los antisueros relevantes y se probaron en tanto estados lavados como sin lavar (es decir, muestras lavadas no tuvieron la solución de transformación).

Después de 48 horas se añadió Celpresol™ a las células de manera que la relación de células finales:no células fuera 3:5 (v/v). Las células continuaron probándose a intervalos. La prueba se interrumpió después de 10 días debido a que las células se volvieron marrones.

Este cambio de color podría atribuirse a varios factores que incluyen: las células ya tenían 21 días de edad cuando se transformaron; la transformación de 48 horas fue en PBS no Celpresol™, por lo que las células se estresaron durante este tiempo; y las células pueden haber sido manipuladas erróneamente en el tránsito entre los laboratorios de transformación y de prueba. Esto puede ser mitigado por la transformación de las células en Celpresol™ a diferencia de PBS.

Tabla 25. Resultados de Diamed de RBC A débiles transformados a 4 ºC contra anti-A.

Tiempo	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) (mg/ml)					
	Lavados			Sin lavar		
	0,08	0,05	0,03	0,08	0,05	0,03
2 h	0	0	0	0	0	0
4 h	1 +	0	0	2+	0	0
6 h	2+	0	0	2+	0	0
8 h	2+	0	0	2-3+	0	0
12 h	2-3+	0	0	3+	1+	0
24 h	3-4+	1+	0	3-4+	2+	0
30,5 h	3-4+	1+	0	3-4+	2+	0
48 h	4+	2+	0	4+	2+	0
72 h	4+	2+	0	4+	2-3+	0
96 h	4+	2-3+	0	4+	2-3+	0
Día 7				3-4+	2+	0
Día 10				3-4+	2+	0

Tabla 26. Resultados de Diamed de RBC B débiles transformados a 4 ºC contra anti-B.

Tiempo	B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) (mg/ml)					
	Lavados			Sin lavar		
	0,6	0,3	0,15	0,6	0,3	0,15
2 h	0	0	0	0	0	0
4 h	0	0	0	1+	0	0
6 h	w+	0	0	1+	0	0
8 h	2+	0	0	2+	w+	0
12 h	2+	w+	0	2-3+	2+	0
24 h	4+	3+	2+	4+	3+	2+
30,5 h	4+	2-3+	0	4+	2-3+	w+
48 h	4+	3+	1+	4+	3+	2+
72 h	4+	4+	2+	4+	4+	2+
96 h	4+	3-4+	2-3+	4+	3-4+	2-3+
Día 7				4+	2-3+	0
Día 10				4+	2+	0

Tabla 27. Resultados de Diamed de RBC AB débiles transformados a 4 ºC en título de bloqueo contra anti-A.

Día	B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) (mg/ml)	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) (mg/ml)					
		Lavados			Sin lavar		
		0,07	0,06	0,05	0,07	0,06	0,05
1	0,3	2+	1-2+	w+	2-3+	2+	1+
	0,2	2+	1-2+	0	2-3+	2+	1+
5	0,3	2+	1-2+	1+	2-3+	2+	1-2+
	0,2	2+	1-2+	w+	2-3+	2+	1-2+
8	0,3				2-3+	2+	2+

Día	B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) (mg/ml)	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) (mg/ml)					
		Lavados			Sin lavar		
		0,07	0,06	0,05	0,07	0,06	0,05
	0,2				2-3+	2+	1-2+

Tabla 28. Resultados de Diamed de RBC AB débiles transformados a 4 ºC en título de bloqueo contra anti-B.

Día	B_{tri}-Sp-Ad-DOPE (VI) (mg/ml)	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (1) (mg/ml)					
		Lavados			Sin lavar		
		0,07	0,06	0,05	0,07	0,06	0,05
1	0,3	3+	3+	2+	3+	3+	2-3+
	0,2	1+	1-2+	0	2+	2+	1-2+
5	0,3	2+	2+	1 +	2+	2+	2+
	0,2	0	w+	vw	1+	w+	vw
8	0,3				2+	2+	2+
	0,2				1+	1+	0

Ejemplo 4 - Eficiencia de inserción de la transformación de RBC por glucolípidos sintéticos A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI)

Se añadieron puras las soluciones de sobrenadante post-transformación (de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a 0,08 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0,03 mg/ml, y B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) a 0,6 mg/ml, 20 µl) y en una dilución 1:2 a concentrado de RBC lavado (60 µl). Los tubos se incubaron en un baño de agua a 37 ºC durante una hora, teniendo lugar mezcla cada 15 minutos.

Los RBC transformados se lavaron 3x con PBS y luego se suspendieron en Cellstab™ a la concentración apropiada para la prueba de serología.

Tabla 29. Serología de tubo

Conc pre-trans (mg/ml)	Puntuación
A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) a 0,08	0
1:2 de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) a 0,08	0
A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) a 0,05	0
1:2 de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) a 0,05	0
A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) a 0,03	0
1:2 de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) a 0,03	0
B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**) a 0,60	vw+
1:2 de B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**) a 0,60	0

La puntuación dada por la solución de sobrenadante post-transformación (desde los 0,08 mg/ml de la solución pre-transformación) no es incluso aquella de los 0,03 mg/ml de la solución de transformación en el primer pase (w+). Estos resultados indican que >75 % de las moléculas se insertan en la membrana de RBC en el primer pase.

Además, las soluciones post-transformación se concentraron 20x y se compararon en paralelo con las soluciones de transformación de concentración conocida. Solo se probaron las soluciones de post-transformación derivadas de los 0,08 mg/ml de soluciones de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y 0,6 mg/ml de B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)**.

Se dializaron las soluciones post-transformación (20 µl) (tamaño de poro 500 Da) contra agua desionizada durante 2 días. Las muestras se dejaron secar en una campana extractora durante 10 días. Al final de este tiempo se transfirieron a un matraz de rotavapor y se pusieron en el rotavapor para girar a vacío sin calor durante la noche.

Se secaron muestras en un baño de agua a 40 ºC y se lavaron en recipientes más pequeños con cloroformo-metanol 2:1 dejando cantidades significativas de material celular secado. Los lavados con 2:1 de cloroformo-metanol 2:1 se secaron, se lavaron otra vez en tubos de ensayo con cloroformo-metanol 2:1 y se secaron. Estas muestras se redisolvieron en 1 ml de 1 x PBS y se usaron para experimentos de transformación. El material celular en la parte inferior de los matraces se lavó con agua en otro conjunto de tubos.

Se añadieron las soluciones post-transformación (de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a 0,08 mg/ml y B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,6 mg/ml, 20 µl) a concentrado de RBC lavado (60 µl). En paralelo, se añadieron las soluciones de transformación (A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a 0,08 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0,03 mg/ml, y B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,6 mg/ml, 20 µl) a concentrado de RBC lavado (60 µl).

Los tubos se incubaron en un baño de agua a 37 ºC durante una hora, teniendo lugar mezcla cada 15 minutos. Los RBC transformados se lavaron 3x con PBS y luego se suspendieron en Cellstab™ a la concentración apropiada para la prueba de serología.

Tabla 30. Serología de Diamed

conc (mg/ml)	Puntuación
A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** a 0,08	3+
A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** a 0,05	2+
A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** a 0,03	1+
A partir de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) a 0,08	0
B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,60	4+
A partir de B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a 0,60	0

Estos resultados sugieren que no hay moléculas suficientes en la solución post-transformación, incluso cuando se concentró 20x, para ser detectadas por serología.

Ejemplo 5 - Transformación de RBC murinos por glucolípido sintético H_{tri}-sp-Ad-DOPE (VII)

Se transformaron células de ratón a 37 ºC durante 1 hora.

Tabla 31. Reactivos anti-H usados para los resultados en las Tablas 32 y 33.

Antisuero	Fabricante	Lote
IgM anti-H	Japanese Red Cross	HIRO-75
UEA	Lorne Laboratories	11549E D.O.E.06.2004
Bio-UEA	EY Labs	201105-2

Tabla 32. Serología de tubo.

Células	Antisuero H			
	IgM	UEA		Bio-UEA
		T=0	T=20	
RBC de ratón (- control)	0	0	0	
RBC de ratón + 0,01 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**	0			
RBC de ratón + 0,05 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**	1+			
RBC de ratón + 0,1 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**	3+			
RBC de ratón + 0,25 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**	4+			1+
RBC de ratón + 1 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**		2+		2+
RBC O humanos (+ control)	4+	1+	2/3+	4+

Tabla 33. Diamed

Células	Puntuación
RBC de ratón + 0,01 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**	0
RBC de ratón + 0,05 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**	0
RBC de ratón + 0,1 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII)**	2+
RBC de ratón + 0,25 mg/ml de H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI**I)	3+

Ejemplo 6 - Transformación de RBC por glucolípido sintético A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) filtrado

Algunos A_{tri}-sp-Ad-DOPE **(I)** se habían esterilizado por filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Para investigar si la transformación sería la misma con este producto se hizo un ensayo comparativo.

Tabla 34. Anti-A usado para los resultados presentados en la Tabla 35.

Fabricante	Ref de catálogo	Número de lote	Fecha de caducidad
BioClone, OCD	Reactivo experimental	01102	-

Tabla 35. Aglutinación en columna de RBC A transformados con concentraciones variables de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) esterilizado por filtración frente a sin filtrar.

Concentración (mg/ml)	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) esterilizado por filtración	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) sin filtrar
0,2	4+	4+
0,1	4+	3-4+
0,05	2-3+	2-3+
0,01	0	0
Control 37 ºC	0	
Control 25 ºC	0	

Estos resultados no muestran diferencia significativa entre las dos preparaciones de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (1) y sugiere que la filtración a través de un filtro de 0,2 µM no eliminó las moléculas o cambió la composición o propiedades del fluido a un grado tal que se afectara la transformación.

Ejemplo 7 - Almacenamiento de células transformadas

Para investigar si el almacenamiento a 4 ºC o 37 ºC cambió o no los resultados de aglutinación de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y RBC O transformados con glucolípido A natural, identificados como células "Syn-A" y "Nat-A" respectivamente, se dividieron en dos y se suspendieron al 5 % en Cellstab™.

Un conjunto de células se almacenó a 4 ºC y el otro conjunto de células se almacenó a 37 ºC en un baño de agua. Se evaluó la aglutinación de las células transformadas guardadas (Tabla 36).

Tabla 36.

Tiempo (horas)	Plataforma	Temp (ºC)	A sin	A nat		Control
			A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a 0,1 mg/ml	A 1 mg/ml	A 10 mg/ml	
0	Tubo		3+	0	1-2+	0
20	Columna	4	4+	0	3+	0
		37	4+	0	3+	0
44	Columna	4	4+		3+	0
		37	4+		3+	0

Ejemplo 8 - Transformación de RBC con glucolípidos sintéticos de antígeno A y B con diferentes estructuras no de hidrato de carbono

Se prepararon los glucolípidos sintéticos solubles en agua designados A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I), A_{tri}-sp_1sp_2-Ad-DOPE **(II),** A_{tri}-sp-Ad-DSPE **(III)** y B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** según el método descrito en el Ejemplo 1 con modificaciones necesarias.

Se añadieron concentrado de glóbulos rojos (RBC) del grupo O lavado (3 partes en volumen) y la solución de glucolípido sintético (1 parte en volumen, concentraciones variables) a un tubo Eppendorf. El tubo se incubó en un baño de agua a 37 ºC durante una hora, mezclando cada 15 minutos. Los RBC transformados se lavaron 3x con PBS y luego se suspendieron en Cellstab™ a la concentración apropiada para la prueba de serología.

Se proporcionan resultados de serología de tubo y de la tarjeta de gel Diamed para RBC transformados con las diferentes construcciones de molécula sintética en la Tabla 38. Los resultados para la estabilidad de los RBC transformados con los diferentes glucolípidos sintéticos a diferentes concentraciones se proporcionan en las Tablas 39 a 44.

Tabla 37. Antisueros usados para los resultados presentados en las Tablas 38 a 44.

Antisuero	Fabricante	Lote
Anti-A Albaclone	SNBTS	Z0010770 - D.O.E 12.12.04
Anti-A Bioclone	Ortho Diagnostics	01102 - D.O.M 16.05.02
Anti-B Albaclone	SNBTS	Z0110670 - D.O.E 12.12.04
Anti-B Bioclone	Ortho Diagnostics	01103 - D.O.M 16.05.02

Tabla 38. Comparación de la transformación de RBC usando glucolípidos sintéticos de antígeno A a diferentes concentraciones.

		Antisuero A			
		Anti-A Albaclone		Anti-A Bioclone	
Sintético	Conc mg/ml	Tubo	Diamed	Tubo	Diamed
A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I)	0,25	n.d.	4+	n.d.	4+
	0,1	n.d.	4+/3+	n.d.	4+/3+
	0,05	w+	2+	2+	2+
	0,04	w+	n.d.	1+	n.d.
	0,03	0	n.d.	w+	n.d.
	0,02	0	n.d.	0	n.d.
	0,01	0	0	0	0
A_{tri}-sp-Ad-DSPE **(III)**	0,25	n.d.	0	n.d.	0
	0,1	n.d.	0	n.d.	0
	0,05	0	0	0	0
	0,04	0	n.d.	0	n.d.
	0,03	0	n.d.	0	n.d.
	0,02	0	n.d.	0	n.d.
	0,01	0	0	0	0
A_{tri}-sp_1sp_2-Ad-DOPE **(II)**	0,25	n.d.	4+	n.d.	4+
	0,1	n.d.	4+	n.d.	4+/3+

Sintético	Conc mg/ml	Antisuero A			
		Anti-A Albaclone		Anti-A Bioclone	
		Tubo	Diamed	Tubo	Diamed
	0,05	0	3+	0	3+
	0,04	0	n.d.	0	n.d.
	0,03	0	n.d.	0	n.d.
	0,02	0	n.d.	0	n.d.
	0,01	0	0	0	0
Control incubado	-	0	n.d.	0	n.d.
Control de mesa	-	0	n.d.	0	n.d.
Abreviaturas: n.d. No determinado					

Tabla 39. Ensayo de estabilidad de RBC transformados con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a altas concentraciones (1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml). Aglutinación por serología de tubo manual.

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-A Albaclone			Anti-A Bioclone		
		Concentración de solución de transformación (mg/ml)					
		1	0,5	0,25	1	0,5	0,25
2	Alsevers	4+	4+	4+	4+°	4+°	4+°
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+°	4+°	4+°
10	Alsevers	3+	2+	2+	4+°	4+°	3+
	Cellstab™	4+°	3+°	2+	4+°	4+°	4+°
17	Alsevers	4+	4+	4+	4+°	4+°	4+°
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+°	4+°	4+°
24	Alsevers	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+°	4+	4+
Abreviaturas: ° salpican							

Tabla 40. Ensayo de estabilidad de RBC transformados con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a bajas concentraciones (0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0,025 mg/ml). Aglutinación por serología de tubo manual.

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-A Albaclone			Anti-A Bioclone		
		Concentración de solución de transformación (mg/ml)					
		0,1	0,05	0,025	0,1	0,05	0,025
2	Alsevers	3+/2+	1+	1+/w+	2+	2+/1+	1+
	Cellstab™	3+/2+	2+	1+	3+/2+	3+/2+	2+
8	Alsevers	2+	1+	w+	3+/2+	2+	2+
	Cellstab™	2+	1+/w+	vw	3+°	2+	1+
15	Alsevers	2+	1+	0	3+	2+	Vw
	Cellstab™	4+	w+	0	4+	4+	1+
22	Alsevers	2+	2+	0	3+	2+	w+
	Cellstab™	4+	4+	1+	4+	4+	1+
44	Alsevers	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
-	Cellstab™	4+	2+	W+	4+	2+	w+
Abreviaturas: n.d. No determinado ° salpican							

Tabla 41. Ensayo de estabilidad de RBC transformados con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a altas concentraciones (1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml). Aglutinación en tarjetas de gel de Diamed.

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-A Albaclone			Anti-A Bioclone		
		Concentración de solución de transformación (mg/ml)					
		1	0,5	0,25	1	0,5	0,25
2	Alsevers	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+	4+	4+
10	Alsevers	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+	4+	4+
17	Alsevers	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+	4+	4+
24	Alsevers	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+	4+	4+
45	Alsevers	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+	4+	4+
59	Alsevers	4+	4+		4+	4+	
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+	4+	4+
73	Alsevers						

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-A Albaclone			Anti-A Bioclone		
		Concentración de solución de transformación (mg/ml)					
		1	0,5	0,25	1	0,5	0,25
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+	4+	4+
88	Alsevers						
	Cellstab™	4+	4+	4+	4+	4+	4+

Si hubo células insuficientes para probar, se han dejado espacios en blanco.

Tabla 42. Ensayo de estabilidad de RBC transformados con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) a bajas concentraciones (0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0,025 mg/ml). Aglutinación en tarjetas de gel de Diamed.

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-A Albaclone			Anti-A Bioclone		
		Concentración de solución de transformación (mg/ml)					
		0,1	0,05	0,025	0,1	0,05	0,025
2	Alsevers	4+	2+	0	4+	3+	1+
	Cellstab™	4+	2+	0	4+	3+	1+
8	Alsevers	4+	3+	0	4+	4+	1+
	Cellstab™	4+	3+	0	4+	4+	1+
15	Alsevers	4+	2+	0	4+	3+/2+	1+
	Cellstab™	4+	4+	0	4+	4+	1+
22	Alsevers	4+	3+/2+	0	4+	3+	w+
	Cellstab™	4+	4+	0	4+	4+	1+
29	Alsevers	4+	2+	0	4+	3+	w+
	Cellstab™	4+	3+	0	4+	4+	2+
43	Alsevers	4+	3+	w+	4+	4+	2+
	Cellstab™	4+	4+/3+	0	4+	4+	1+
50	Alsevers	4+	3+	w+	4+	4+	2+
	Cellstab™	4+	3+	0	4+	4+	1+
57	Alsevers	4+	3+/2+		4+	4+	
	Cellstab™	4+	3+	0	4+	3+	w+
63	Alsevers						
	Cellstab™	4+/3+	2+	0	4+	3+	0
71	Alsevers						
	Cellstab™	4+/3+	2+	0	4+	3+	0
86	Alsevers						
	Cellstab™	4+/3+	2+	0	4+	3+	0

Si hubo células insuficientes para probar, se han dejado espacios en blanco.

Tabla 43. Ensayo de estabilidad de RBC transformados con B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) a altas concentraciones (1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml). Aglutinación por serología de tubo manual.

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-B Albaclone			Anti-B Bioclone		
		Concentración de solución de transformación (mg/ml)					
		1	0,5	0,25	1	0,5	0,25
2	Alsevers	3+	3+	2+	2+	1+	1+
	Cellstab™	3+	2+	2+	2+	2+	1+
9	Alsevers	4+	4+	2+	4+	3+	2+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	2+
16	Alsevers	4+	4+	3+	4+	4+	2+
	Cellstab™	4+	4+	2+	4+	4+	2+
23	Alsevers	4+	4+	3+	4+	4+	3+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	3+
30	Alsevers	3+	3+	2+	2+	2+	2+
	Cellstab™	4+	3+	2+	3+°	3+°	2+
37	Alsevers	3+	2+	1+	3+	2+	1+
	Cellstab™	3+	3+	2+/1+	4+°	3+	1+
44	Alsevers	4+	3+	1+	3+	3+	w+
	Cellstab™	4+	4+	n.d.	4+	4+	+
51	Alsevers	3+	3+	2+	4+	3+	2+
	Cellstab™	4+	4+	n.d.	4+	4+	2+

Abreviaturas: ° salpican

Tabla 44. Ensayo de estabilidad de RBC transformados con B_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VI)** a altas concentraciones (1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml). Aglutinación en tarjetas de gel de Diamed.

Día	Solución de almacenamiento de células	Anti-B Albaclone			Anti-B Bioclone		
		Concentración de solución de transformación (mg/ml)					
		1	0,5	0,25	1	0,5	0,25
2	Alsevers	4+	4+	2+	4+	4+	2+
	Cellstab™	4+	4+	2+	4+	4+	2+
9	Alsevers	4+	4+	2+	4+	4+	2+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	3+
16	Alsevers	4+	4+	2+	4+	4+	1+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	3+
23	Alsevers	4+	4+	3+	4+	4+	3+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	3+
30	Alsevers	4+	4+	3+	4+	4+	3+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	3+
37	Alsevers	4+	4+	3+	4+	4+	3+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	3+
44	Alsevers	4+	4+	2+	4+	4+	3+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	4+/3+
51	Alsevers	4+	4+	2+	4+	4+	3+
	Cellstab™	4+	4+	3+	4+	4+	3+
58	Alsevers	4+		1+	4+		2+
	Cellstab™	4+	4+	2+	4+	4+	2+
72	Alsevers	4+		2+	4+		3+
	Cellstab™	4+	4+	3+/2+	4+	4+	3+
87	Alsevers						
	Cellstab™	4+	4+/3+	1+	4+	4+/3+	2+/1+
116	Alsevers						
	Cellstab™	4+	3+	0	4+	4+/3+	1+

Si hubo células insuficientes para probar, se han dejado espacios en blanco.

Ejemplo 9 - Transformación de glóbulos rojos con glucolípidos sintéticos de antígeno H

Se prepararon los glucolípidos sintéticos solubles en agua designados H_{tri}-sp-Ad-DOPE **(VII),** H_{di}-sp-Ad-DOPE **(VIII)** y Galβ-sp-Ad-DOPE **(IX)** según el método descrito en el Ejemplo 1 con modificaciones necesarias.

Se añadieron concentrado de RBC de ratón lavado (3 partes en volumen) y las soluciones de glucolípido sintético (1 parte en volumen de concentraciones variables) a un tubo Eppendorf. El tubo se incubó en un baño de agua a 37 ºC durante una hora, mezclando cada 15 minutos. Los RBC transformados se lavaron 3x con PBS y luego se suspendieron en Cellstab™ a la concentración apropiada para la prueba de serología.

Los resultados de la serología de tubo y de la tarjeta de gel de Diamed para RBC transformados con los diferentes glucolípidos sintéticos se presentan en la Tabla 46. Los resultados muestran que se requieren tres azúcares (H_{tri}) para la detección por IgM anti-H, al menos por el reactivo usado.

Tabla 45. Antisueros usados para los resultados presentados en la Tabla 46.

Antisueros	Fabricante	Lote
IgM Anti-H	Japanese Red Cross	HIRO-75
UEA	Lorne Laboratories	11549E D.O.E.06.2004
Bio-UEA	EY Labs	201105-2

Tabla 46. Comparación de transformación de RBC usando glucolípidos sintéticos de antígeno H con diferentes glucotopes preparados a diferentes concentraciones.

		Antisuero H				
		IgM		UEA		Bio-UEA
Sintético	Conc mg/ml	Tubo	Diamed	Tubo T0	Tubo T20	Tubo
H_{tri}-sp-Ad-DOPE (VII)	1	n.d.	n.d.	2+	n.d.	2+
	0,25	4+	3+	n.d.	n.d.	1+
	0,1	3+	2+	n.d.	n.d.	n.d.
	0,05	1+	0	n.d.	n.d.	n.d.
	0,01	0	0	n.d.	n.d.	n.d.
H_{di}-sp-Ad-DOPE (VIII)	0,25	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0,1	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Sintético	Conc mg/ml	Antisuero H				
		IgM		UEA		Bio-UEA
		Tubo	Diamed	Tubo T0	Tubo T20	Tubo
	0,05	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0,01	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Galβ-sp-Ad-DOPE (IX)	0,25	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0,1	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0,05	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	0,01	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Células O humanas	-	4+	n.d.	1+	2/3+	4+
Control incubado	-	0	n.d.	0	0	n.d.
Control de mesa	-	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Abreviaturas: n.d. No determinado						

Ejemplo 10 - Inserción de glucolípidos sintéticos H_{di}-sp-Ad-DOPE (VIII) y Galβ-sp-Ad-DOPE (IX) en glóbulos rojos murinos

Se prepararon los glucolípidos sintéticos solubles en agua designados H_{di}-sp-Ad-DOPE **(VIII)** y Galβ-sp-Ad-DOPE **(IX)** según el método descrito en el Ejemplo 1 con modificaciones necesarias.

Se lavaron RBC murinos 3x en 1x PBS. Se combinaron 30 µl de concentrado de RBC con 30 µl de H_{di}-sp-Ad-DOPE **(VIII),** y se combinaron 30 µl de concentrado de RBC con 30 µl de Galβ-sp-Ad-DOPE **(IX),** respectivamente. Ambas construcciones de molécula sintética fueron a una concentración de 1,0 mg/ml. Se añadieron 30 µl de 1x PBS a 30 µl de concentrado de RBC para actuar de grupo de control. Las células se incubaron durante 90 minutos en un baño de agua a 37 ºC con agitación. Los RBC se lavaron 3x en 1x PBS.

Se incubaron tres grupos de concentrado de RBC con un volumen igual de lectina UEA-1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. La lectina se preparó en 1x PBS a una concentración de 0,1 mg/ml. Se centrifugaron 50 µl de una suspensión al 3 % de células durante 15 segundos en una Immunofuge a baja velocidad. Los resultados se leyeron por serología de tubo. Los resultados se presentan en la Tabla 48. Los resultados muestran que ni IgM anti-H ni UEA-1 detectan dos azúcares (H_{di}).

Tabla 47. Antisueros usados para los resultados presentados en la Tabla 48.

Antisueros	Fabricante	Lote
anti-H de Biotest	Biotest AG	
UEA	EY Labs	201105-2

Tabla 48. RBC murinos transformados con Galβ-sp-Ad-DOPE o H_{di}-sp-Ad-DOPE, evaluados por aglutinación.

Tipo de célula	Molécula insertada	UEA-1	IgM^H de ratón
RBC murino	Galβ (1 mg/ml)	0	n.d.
RBC murino	H_{di} (1 mg/ml)	0	0
RBC murino	Control (PBS)	0	0
RBC humano	Control (PBS)	4+	3+
Abreviaturas: n.d. No determinado			

Ejemplo 11 - Preparación de controles de sensibilidad

Pueden usarse los glucolípidos sintéticos de la invención en la preparación de "controles de sensibilidad" (también denominados "células de control de calidad", "controles de serología" o "controles de proceso") como se describe en la memoria descriptiva que acompaña a la solicitud internacional N.º PCT/NZ02/00214 (documento WO 03/034074). Los glucolípidos sintéticos proporcionan la ventaja de que la transformación de los RBC puede lograrse a temperaturas reducidas.

Soluciones de transformación de RBC

Se usan dos soluciones madre:

Solución 1: 1 mg/ml de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) suspenso en solución Celpresol™.
Solución 2: 5 mg/ml de B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) suspenso en solución Celpresol™.

Los glucolípidos se fabrican en un polvo seco blanco. Los glucolípidos en esta forma (encerrados en un envase sellado bajo una temperatura controlada) son estables durante un periodo de tiempo indefinido. Los glucolípidos se suspenden en solución (por ejemplo, Celpresol) en peso con el fin de formular las soluciones de transformación.

Una vez las soluciones de transformación son recibidas en CSL, se filtran (a través de una unidad de filtro MILLEX®-

GV de 0,22 µ) en condiciones asépticas.

Procesamiento de RBC

Se procesan donaciones de RBC usando un lavador de centrífuga de flujo continuo en condiciones asépticas. Se lavaron las donaciones de RBC en solución salina tamponada, seguido de solución de Celpresol™. El PCV de las donaciones de RBC se mide en un analizador Beckman Coulter AcT Dif. Las donaciones se ajustan entonces a un volumen de células concentradas (PCV) del 50 % con la adición de Celpresol™.

Transformación de RBC para proporcionar "células AB débiles"

Se lavan RBC en solución salina tamponada y Celpresol™. Las células se suspenden en solución de Celpresol™ a un PCV de > 50 %. El PCV de glóbulos rojos se mide usando un Beckman Coulter AcT Dif. Se pesa la masa de la solución de glóbulos rojos.

La cantidad de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I), B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) y Celpresol™ para la transformación se calcula usando las siguientes ecuaciones:

$$a = \frac{P \times F}{S}$$

$$b = \frac{P \times F}{S}$$

$$c = P - (1 - P) - a - b$$

donde

a = cantidad de A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) que va a añadirse por 1 ml de glóbulos rojos (ml)
b = cantidad de B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) que va a añadirse por 1 ml de glóbulos rojos (ml)
c = cantidad de Celpresol™ que va a añadirse por 1 ml de glóbulos rojos (ml) para diluir las células al 50 % de PCV
P = PCV de solución de glóbulos rojos
F = concentración final deseada de glucolípido
S = concentración de la solución de glucolípidos de reserva

Para determinar la cantidad de glucolípido y Celpresol™ para añadir a una muestra a granel de glóbulos rojos, multiplicar cada uno de a, b y c por el volumen de glóbulos rojos. Añadir A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**), B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**) y Celpresol™ a la muestra a granel de glóbulos rojos asépticamente.

Incubar la muestra durante 3 horas a 20 ºC bajo condiciones de temperatura controlada y agitación suave constante. Al final del periodo de 3 horas, sacar asépticamente una muestra de glóbulos rojos y probar la muestra para confirmar la transformación de los RBC. Realizar agrupación de sangre usando tubo, mosaico y técnicas de tecnología de aglutinación en columna (CAT).

Incubar la muestra de glóbulos rojos durante 3 horas a 2-8 ºC bajo condiciones de temperatura controlada y agitación suave constante durante 18 horas. Al final del periodo de 3 horas, sacar asépticamente una muestra de glóbulos rojos y probar la muestra para confirmar la transformación de los glóbulos rojos. Realizar la determinación del grupo sanguíneo usando técnicas de tubo, mosaico y CAT.

Lavar los glóbulos rojos transformados usando un método de centrífuga de flujo continuo, bajo condiciones asépticas usando solución de Celpresol™. Medir el PCV de los glóbulos rojos lavados y ajustar al 50 % de PCV mediante la adición de solución de Celpresol™.

Formulación y dispensación

Combinar asépticamente un volumen de los RBC transformados con un volumen de diluyente de plasma simulado (SPD). El plasma puede contener anticuerpos monoclonales y policlonales. Los anticuerpos se seleccionan según las características deseadas de los controles de sensibilidad. El plasma puede contener además tartrazina y albúmina de suero bovino.

Se realiza la determinación del grupo sanguíneo y el cribado de anticuerpos en las muestras a granel usando tubo, mosaico y técnicas de CAT. La mezcla RBC de transformados-SPD se dispensa entonces asépticamente en tubos BD Vacutainer y los tubos se etiquetan en consecuencia.

Prueba de validación

Se usaron células AB débiles producidas usando glucolípidos sintéticos (designadas A_wB_w en las Tablas 51 a 53) para validar un intervalo de plataformas de prueba en paralelo con células A débiles, B débiles y AB débiles que existen de forma natural.

Tabla 49. Reactivos y tarjetas usadas en la prueba de validación.

Método	Reactivo		
Tubo	Epiclone		
Mosaico	Epiclone		
Ref	Fabricante y tipo	Lote	Caducidad
CA 1	OCD BioVue ABD/Rev	ABR528A	16.06.05
CA 2	OCD BioVue ABD/Rev	ABR521A	06.05.06
CA 3	OCD BioVue ABD/ABD	ACC255A	24.05.05
CA 4	Diamed ID-MTS	50092.10.02	Abril-05
CA 5	Diamed ID-MTS Tipificación de donante	51051.05.04	Marzo-05
CA 6	Diamed ID-MTS Tipificación de receptor	50053.07.02	Abril-05
CA 7	Diamed ID-MTS Tipificación de médula	50961.08.03	Julio-05

Tabla 50. Metodología de la plataforma de prueba para la prueba de validación.

Mosaico	1 gota de 3 % de células, 2 gotas de reactivo, 15 min a TA en cámara húmeda.
Tubo	2 gotas a TA, 10 min.
ID-MTS	Según instrucciones del fabricante usando Dil-2.
BioVue	Según instrucciones del fabricante usando 0,8 % de RCD.

Tabla 51. Resultados de la validación a través de todos los métodos contra anti-A.

		Plataforma de prueba								
Célula	Tipo	Tubo	Mosaico	CA 1	CA 2	CA 3	CA 4	CA 5	CA 6	CA 7
1	A_x	w+	0	2+		1+	0	0	0	0
2	A_x	w+	0	2+		2+	0	0	0	0
3	A_1B	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
4	A_x	w+	0	2+		2+	0	0	0	0
5	A_2B	3+	3+	4+		3+	3+	1+	2+	3+
6	A_x	w+	0	2+		2+	0	0	0	0
7	A_x	1+	0	2+		2+	0	0	0	0
8	A_x	w+	0	2+		2+	0	0	0	0
9	A_x	0	0	1+		1+	0	0	0	0
10	A_x	w+	0	2+		2+	0	0	0	0
11	A_3	4+	4+	4+		3+	3+	1+	1+	3+
12	A_3B	3+	3+	3+		3+	2+	w+	w+	2+
13	B_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	B_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	A_wB_w	2+	2+	2+	2+	2+	0	0	0	0

Tabla 52. Resultados de la validación a través de todos los métodos contra anti-B.

		Plataforma de prueba								
Célula	Tipo	Tubo	Mosaico	CA 1	CA 2	CA 3	CA 4	CA 5	CA 6	CA 7
1	A_x	0	0	0		0	0	0	0	0
2	A_x	0	0	0		0	0	0	0	0
3	A_1B	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	4+
4	A_x	0	0	0		0	0	0	0	0
5	A_2B	4+	4+	4+		4+	4+	3+	3+	4+
6	A_x	0	0	0		0	0	0	0	0
7	A_x	0	0	0		0	0	0	0	0
8	A_x	0	0	0		0	0	0	0	0
9	A_x	0	0	0		0	0	0	0	0
10	A_x	0	0	0		0	0	0	0	0
11	A_3	0	0	0		0	0	0	0	0
12	A_3B	4+	4+	4+		4+	4+	4+	4+	4+
13	B_3	2+	2+	3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
14	B_3	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	1+	2+
15	A_wB_w	3+	3+	1+	1+	1+	0	0	0	0

Tabla 53. Resultados de la validación a través de todos los métodos contra anti-AB.

		Plataforma de prueba								
Célula	Tipo	Tubo	Mosaico	CA 1	CA 2	CAT	CA 4	CA 5	CA 6	CA 7
1	A_x	3+	2+							2+
2	A_x	4+	2+							3+
3	$A_1$8	4+	4+							4+
4	A_x	3+	2+							3+
5	A_2B	4+	4+							4+
6	A_x	4+	4+							3+
7	A_x	4+	4+							3+
8	A_x	3+	4+							3+
9	A_x	4+	2+							2+
10	A_x	3+	4+							3+
11	A_3	4+	4+							4+
12	A_3B	4+	4+							4+
13	B_3	2+	2+							2+
14	B_3	2+	2+							2+
15	A_wB_w	3+	3+							3+

Ejemplo 12 - Unión de embriones modificados a células endometriales transformadas

Se investigó la capacidad para efectuar diferencias cualitativas y cuantitativas en los antígenos de superficie celular expresados por tipos de células distintos de RBC. Se adoptó la capacidad para potenciar la adhesión de embriones a células endometriales como sistema modelo.

Pueden usarse moléculas sintéticas como anclajes de membrana sintética y/o construcciones de molécula sintética. Por tanto, también pueden emplearse en el método de potenciamiento de la implantación de embriones como se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/NZ2003/000059 (publicada como WO 03/087346) que se incorpora por referencia.

• Transformación de células endometriales

Inserción de construcción de molécula sintética soluble en agua

Se preparó una suspensión de células individuales de células epiteliales endometriales. Las células endometriales se lavaron 3x resuspendiendo en CMF HBSS y centrifugando a 2000 rpm durante 3 minutos.

Se resuspendió la preparación de células lavadas en 50 µl de M2.

Se prepararon micro-tubos de centrifugadora que contenían cada uno 50 µl de solución de 5M/ml de células endometriales. Para separar tubos de células endometriales se añadieron 50 µl de glucolípidos sintéticos A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) o B_{tri}-sp-Ad-DOPE A (**VI**), o 50 µl de M2 a las células de control. Las células se incubaron durante 90 minutos a 37 ºC en una mezcladora. Las células endometriales se lavaron 3x resuspendiendo en medio CMF HBSS y centrifugando a 2000 rpm durante 3 minutos. La preparación de células lavadas se resuspendió en 50 µl de M2.

Prueba de inserción usando sonda fluorescente:

Se añadieron 50 µl de anticuerpo monoclonal murino primario correspondiente a cada tubo. Cada tubo se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se lavaron 3x en medio M2. Se añadieron 10 µl de FITC anti-IgG de ratón a cada tubo. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente en condiciones oscuras durante 10 minutos. Se montaron células endometriales en portaobjetos de vidrio y se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia.

Prueba de aglutinación directa:

Se dispusieron 5 µl de cada grupo de células en portaobjetos de microscopio separados. A cada 5 µl de gota de células se añadieron 5 µl de un anticuerpo correspondiente. Las células se mezclaron suavemente en el portaobjetos durante 2 minutos. La aglutinación se visualizó bajo microscopio. Los resultados se presentan en la Tabla 55.

Tabla 54. Antisueros usados para los resultados presentados en la Tabla 55.

Antisuero	Fabricante	
Anti-A Bioclone	Ortho Diagnostics	01102 D.O.M. 16.05.02
Anti-B Bioclone	Ortho Diagnostics	Reactivo de desarrollo

Tabla 55. Células endometriales transformadas con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) o B_{tri}-sp-Ad-DOPE A (**VI**), como se visualiza usando fluorescencia.

Tipo de célula	Antígeno insertado	1º anticuerpo	Puntuación de fluorescencia después de la incubación con sonda Ig-FITC	Reacción de aglutinación por visualización microscópica
Células endometriales	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) (1 mg/ml)	Anti-A Bioclone	4+	4+
Células endometriales	B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**) (1 mg/ml)	Anti-B Bioclone	1+	3+
Células endometriales	Control (medio M2)	Anti-A Bioclone	0	0
• **Modificación de embriones**				

Inserción de la construcción de molécula sintética soluble en agua:

Se eliminó la zona pelúcida del embrión tratando embriones con 0,5 % de Pronase en una estufa a 37 ºC durante 6 minutos o hasta que se eliminaron todas las zonas. Se prepararon micro-gotas añadiendo 5 µl de glucolípido sintético A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) o B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**), a una concentración de 1 mg/ml a una gota de 45 µl de medio M2 recubierto con aceite mineral. Todos los grupos de embriones se incubaron en las microgotas de 50 µl durante 1 hora a 37 ºC. Se lavaron los embriones de grupos experimentales y de control 3x con medio M2.

Prueba de inserción:

Se colocaron embriones de grupos experimentales y de control en una micro-gota de anticuerpo correspondiente y se incubaron durante 30 min a 37 ºC. Se lavaron embriones de grupos experimentales y de control 3x con medio M2.

Se colocaron embriones de todos los grupos experimentales y de control en micro-gotas de anti-Ig-FITC de ratón (dilución 1:50 de anti-Ig-FITC de ratón en M2) y se incubaron durante 30 min a 37 ºC. Se lavaron embriones de grupos experimentales y de control 3x con medio M2. Los embriones se montaron en portaobjetos de microscopio en una gota de 5 µl de M2 y las gotas se recubrieron con aceite.

Los portaobjetos se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia. Los resultados se presentan en las Tablas 56 y 57. El resultado negativo para la transformación con B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI) se atribuye a una falta de sensibilidad al 1º anticuerpo.

Tabla 56. Embriones transformados con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I), como se visualiza usando fluorescencia.

Tipo de célula	Antígeno insertado	1º anticuerpo	Puntuación de fluorescencia después de incubación con sonda de Ig-FITC	Morfología del embrión 24 h después de la inserción
Embriones	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I)	Anti-A Bioclone	2+/1+	Pareció viable
Embriones	Control	Anti-A Bioclone	0	Pareció viable

Tabla 57. Embriones transformados con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) o B_{tri}-sp-Ad-DOPE (VI), como se visualiza usando fluorescencia.

Tipo de célula	Antígeno insertado	1 anticuerpo	Puntuación de fluorescencia después de incubación con sonda de Ig-FITC	Morfología del embrión 24 h después de la inserción
Embriones	A_{tri}-Sp-Ad-DOPE (**I**)	Anti-A Bioclone	2+	n.d.
Embriones	B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**)	Anti-B Bioclone	0	n.d.
Embriones	Control (M2 medios)	Anti-A Bioclone	0	n.d.
Abreviaturas: n.d. No determinado				

Unión potenciada de células endometriales transformadas a embriones modificados

Se prepararon embriones modificados (BioG-Avidina-BiolgG^B y BioG-Avidina-BiolgM^A) según los métodos descritos en la memoria descriptiva que acompaña a la solicitud internacional N.º PCT/NZ03/00059 (publicada como WO03/087346).

Se prepararon dos portaobjetos de vidrio cóncavos, uno con dos pocillos de células endometriales insertadas en glucolípido sintético A_{tri}-sp-Ad-DOPE (I) y el otro con dos pocillos de células endometriales insertadas en glucolípido

sintético B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**).
Los dos grupos de embriones se transfirieron a cada uno de los portaobjetos de vidrio cóncavos:

Portaobjetos 1

embriones A_{tri}/IgG^B
embriones A_{tri}/IgM^A

Portaobjetos 2

embriones B_{tri}/IgG^B
embriones B_{tri}/IgM^A

Los embriones fueron rodeados con células endometriales. Los pocillos se cubrieron con aceite mineral y se incubaron durante 15 minutos a 37 ºC. Usando una pipeta de manipulación de perforación ancha, se transfirió cada grupo de embriones cuidadosamente a una gota nueva de medio M2. Los embriones se lavaron suavemente. Los embriones se transfirieron suavemente a 2 µl de medio M2 en un portaobjetos de microscopio marcado. Cada gota se recubrió con aceite mineral

Bajo un plano central de foco en un microscopio Olympus se evaluó el número de células endometriales adheridas a los embriones en cada grupo. Se registró el número de células adheridas a cada embrión. Los resultados se presentan en la Tabla 58.

Tabla 58. Células endometriales transformadas con A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**) o B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**), y embriones modificados con BioG-Avidina-$BiolgG^B$ o BioG-Avidina-$BiolgM^A$. Evaluación por unión de células endometriales a embriones.

Tipo de célula	Células endometriales transformadas	Embriones modificados	Número promedio de células endometriales unidas a embriones modificados
Células endometriales	A_{tri}-sp-Ad-DOPE (**I**)	BioG-Avidina-$BioIgG^B$	2,3
		BioG-Avidina-$BiolgM^A$	7,25
Células endometriales	B_{tri}-sp-Ad-DOPE (**VI**)	BioG-Avidina-$BiolgG^B$	6,7
		BioG-Avidina-$BiolgM^A$	3,4

Donde en la descripción anterior se ha hecho referencia a números enteros o componentes que tienen equivalentes conocidos, entonces tales equivalentes se incorporan en el presente documento como si se expusieran individualmente.

Aunque la invención se ha descrito a modo de ejemplo y con referencia a posibles realizaciones de la misma, deberá apreciarse que pueden hacerse mejoras y/o modificación a la misma.

Referencias

Abe K, McKibbin JM & Hakomori SI. (1983) The monoclonal antibody directed to difucosylated type 2 chain (Fucα1→2Galβ1→4[Fucα1→3]GlcNAc; Y determinant). J. Biol. Chem. 258: 11793-11797.

Adamany AM, Blumenfeld OO, Sabo B & McCreary J. (1983) A carbohydrate structural variant of MM glycoprotein (glycophorin A). J. Biol. Chem. 258: 11537-11545.

Blanchard D, Cartron JP, Fournet B, Mountreuil J, van Halbeek H & Vliegenthart JFG. (1983) Primary structure of the oligosaccharide determinant of blood group Cad specificity. J. Biol. Chem. 258: 7691-7695.

Fukuda M, Dell A & Fukuda M. (1984a) Structure of fetal lactosaminoglycan. The carbohydrate moiety of band 3 isolated from human umbilical cord erythrocytes. J. Biol. Chem. 259: 4782-4791.

Fukuda M, Dell A, Oates JE & Fukuda M. (1984b) Structure of branched lactosaminoglycan, the carbohydrate moiety of band 3 isolated from adult human erythrocytes. J. Biol. Chem. 259: 8260-8273.

Fukuda M, Lauffenberger M, Sasaki H, Rogers ME & Dell A. (1987) Structures of novel sialylated O-linked oligosaccharides isolated from human erythrocyte glycophorins. J. Biol. Chem. 262: 11952-11957.

Fukuda MN, Dell A, Oates JE, Wu P, Klock JC & Fukuda M. (1985) Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. The presence of a series of linear poly-N-acetyllactosaminylceramide and its significance in glycolipids of whole blood cells. J. Biol. Chem. 260: 1067-1082.

Gillard BK, Blanchard D, Bouhours JF, Cartron JP, van Kuik JA, Kamerling JP, Vliegenthart JFG & Marcus DM. (1988) Structure of a ganglioside with Cad blood group antigen activity. Biochemistry. 27: 4601-4604.

Hakomori SI, Nudelman E, Levery SB & Kannagi R. (1984) Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. I. Glycilipids with di- or trifucosylated type 2 chain. J. Biol. Chem. 259: 4672-4680

Hanfland P. (1975) Characterisation of B and H blood group active glycosphingolipids from human B erythrocyte membranes. Chem. Phys. Lipids. 15: 105-124.

Hanfland P, Kordowicz M, Niermann H, Egge H, Dabrowski U, Peter-Katalinic J & Dabrowski J. (1984) Purification and structures of branched blood-group-B-active glycosphingolipids from human erythrocyte membranes. Eur. J. Biochem. 145: 531-542.

Hanfland P, Kordowicz M, Peter-Katalinic J, Pfannschmidt G, Crawford RJ, Graham HA & Egge H. (1986) Immunochemistry of the Lewis blood-group system: isolation and structures of Lewis-c active and related glycosphingolipids from the plasma of blood-group O Le(a-b-) nonsecretors. Arch. Biochem. Biophys. 246: 655-672.

Hiraiwa N, Tsuyuoka K, Li YT, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, Fukuda Y, Imura H & Kannagi R. (1990) Gangliosides and sialoglycoproteins carrying a rare blood group antigen determinant, Cad, associated with human cancers as detected by specific monoclonal antibodies. Cancer Res. 50: 5497-5503.

Kannagi R , Nudelman E, Levery SB, & Hakomori SI. (1982) A series of human erythrocytes glycosphingolipids reacting to the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen, SSEA-1. J. Biol. Chem. 257: 14865-14874.

Kewitz S, Groß HJ, Kosa R & Roelcke D. (1995) Anti=Pr cold agglutinins recognise immunodominant α2,3- or α2,6-sialyl groups on glycophorins. Glycocon. J. 12: 714-720.

Koscielak J, Miller-Podraza H, Krauze R & Piasek A. (1976) Isolation and characterisation of poly(glycosyl)ceramides (megaloglycolipids) with A, H, and I blood group activities. Eur. J. Biochem. 71: 9-18.

Laine RA. (1994) Invited commentary. Glycobiol 4: 759-767

Lidowska E, Duk M & Dahr W. (1980) Comparison of alkali-labile oligosaccharide chains of M and N blood-group glycopeptides from human erythrocyte membrane. Carbohydr. Res. 79: 103-113.

Lloyd KO & Kabat EA. (1968) Immunochemical studies on blood groups. XLI. Proposed structures for the carbohydrate portions of blood group A, B, H, Lewisa, and Lewisb substances. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 61: 1470-1477.

Lundblad A. (1977) Urinary glycoproteins, glycopeptides, and oligosaccharides. In: The Glycoconjugates Eds Horowitz MI & Pigman W. Vol 1: 441-458.

Magnani JL, Nilsson B, Brockhaus M, Zopf D, Steplewski Z, Koprowski H & Ginsburg V. (1986) A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. J. Biol. Chem. 257: 14365-14369.

Nudelman E, Fukushi Y, Levery SB, Higuchi T & Hakomori SI. (1986) Novel fucolipids of human adenocarcinoma: disialoyl Lea antigen (III4FucIII6NeuAclV3NeuAcLc4) of human colonic adenocarcinoma and the monoclonal antibody (FH7) defining this structure. J. Biol. Chem. 261: 5487-5495.

Slomiany A, Zdebska E & Slomiany BL. (1984) Structures of the neutral oligosaccharides isolated from A-active human gastric mucin. J. Biol. Chem. 259:14743-14749.

Takasaki S, Yamashita K & Kobata A. (1978) The sugar chain structures of ABO blood group active glycoproteins obtained from human erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. 253: 6086-6091.

Tanaka M, Dube VE & Anderson B. (1984) Structures of oligosaccharides cleaved by base-borohydride from an I, H, and Lea active ovarian cyst glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta. 798: 283-290.

Thomas DB & Winzler RJ. (1969) Structural studies on human erythrocytes glycoprotein. Alkali-labile oligosaccharides. J. Biol. Chem. 244: 5943-5946.

Watkins WM. (1966) Blood group substances. Science. 152: 172-181.

Yoshima H, Furthmayr H & Kobata A. (1980) Structures of the asparagine-linked sugar chains of glycophorin A. J. Biol. Chem. 255: 9713-9718.

REIVINDICACIONES

1. Una **construcción** soluble en agua de la estructura F-S_1-S_2-L donde F es un glucotope, S_1 es 2-aminoetilo, 3-aminopropilo, 4-aminobutilo o 5-aminopentilo, S_2 es -$CO(CH_2)_2CO$-, -$CO(CH_2)_3CO$-, -$CO(CH_2)_4CO$- o - $CO(CH_2)_5CO$- y L es fosfatidiletanolamina.

2. La construcción de la reivindicación 1, donde L deriva de uno o más ácidos grasos *cis*-desaturados.

3. La construcción de la reivindicación 2, donde L es 1,2-O-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina.

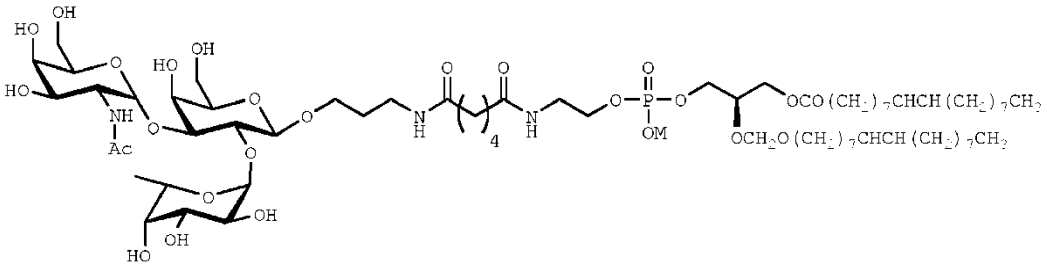
4. La construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde S_1 es 3-aminopropilo.

5. La construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el glucotope consiste en tres o más unidades de azúcar.

6. La construcción de la reivindicación 5, donde F es un glucotope seleccionado del grupo que consiste en las series de lacto-neo-tetraosilo, lactotetraosilo, lacto-nor-hexaosilo, lacto-iso-octaosilo, globoteraosilo, globo-neo-tetraosilo, globopentaosilo, gangliotetraosilo, gangliotriaosilo, gangliopentaosilo, isoglobotriaosilo, isoglobotetraosilo, mucotriaosilo y mucotetraosilo de oligosacáridos.

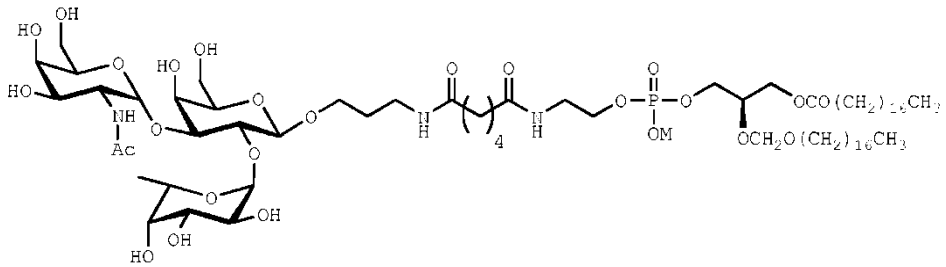
7. La construcción de la reivindicación 5, donde F comprende el azúcar terminal GalNAcα1-3(Fucαl-2)Galβ; Galα1-3Galβ; Galβ; Galα1-3(Fucαl-2)Galβ; NeuAcα2-3Galβ; NeuAcα2-6Galβ; Fucα1-2Galβ; Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-6(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ; Galα1-4Galβ1-4Glc; GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc; GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc o GalNAcβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glc.

8. La construcción de la reivindicación 3 de la estructura:



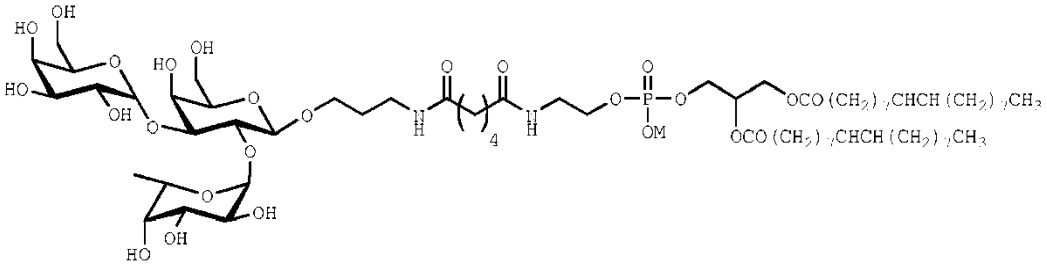
donde M es un catión monovalente.

9. La construcción de la reivindicación 1 de la estructura:



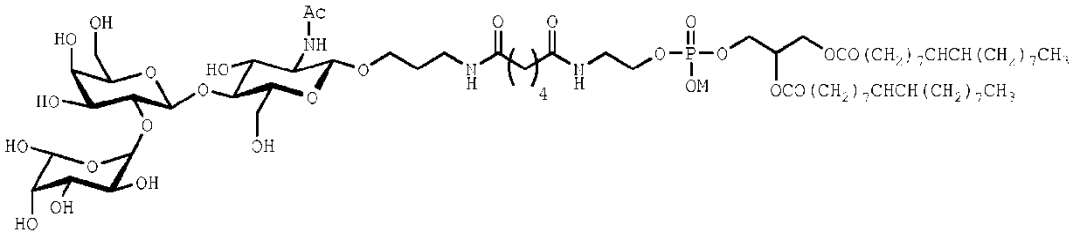
donde M es un catión monovalente.

10. La construcción de la reivindicación 3 de la estructura:



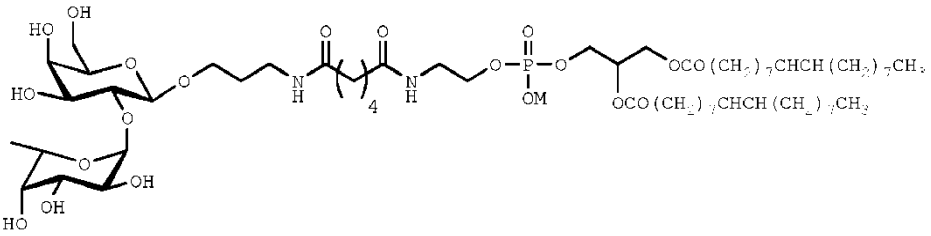
donde M es un catión monovalente.

11. La construcción de la reivindicación 3 de la estructura:



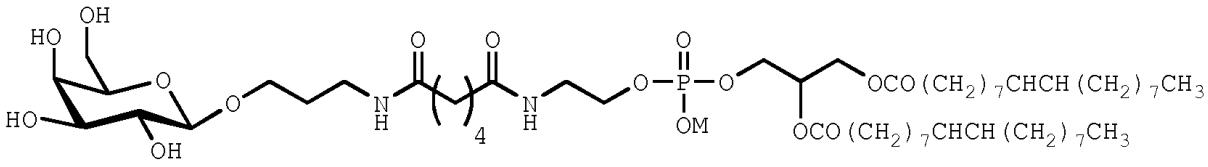
donde M es un catión monovalente.

12. La construcción de la reivindicación 3 de la estructura:



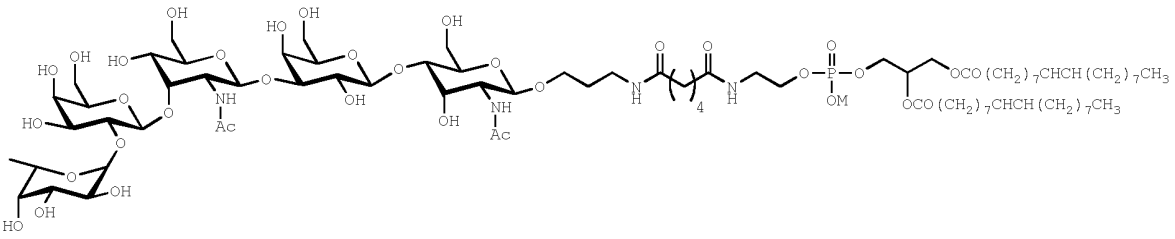
donde M es un catión monovalente.

13. La construcción de la reivindicación 1 de la estructura:



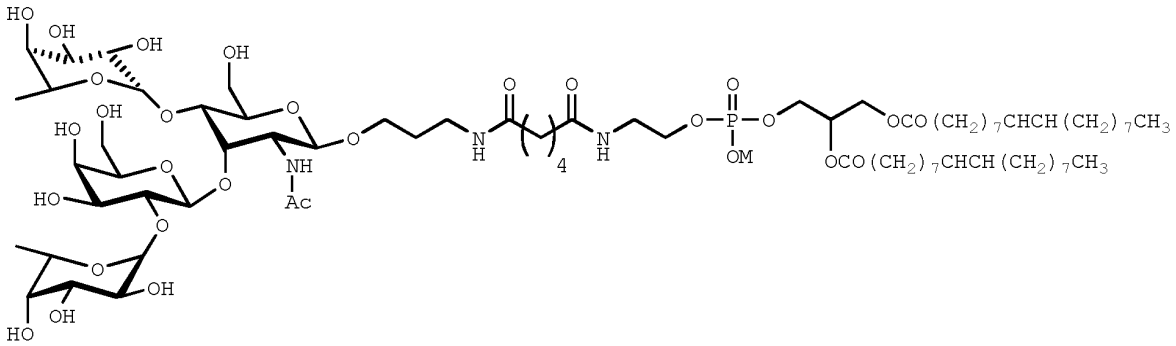
donde M es un catión monovalente.

14. La construcción de la reivindicación 1 de la estructura:



donde M es un catión monovalente.

15. La construcción de la reivindicación 3 de la estructura:



donde M es un catión monovalente.

16. Un método *ex vivo* de efectuar cambios cualitativos y/o cuantitativos en los antígenos de superficie expresados por una célula que incluye la etapa de poner en contacto una suspensión de la célula con una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 durante un tiempo y a una temperatura suficiente para efectuar el cambio.

17. Un método no terapéutico de efectuar cambios cualitativos y/o cuantitativos en los antígenos de superficie expresados por una célula que incluye la etapa de poner en contacto una suspensión de la célula con una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 durante un tiempo y a una temperatura suficiente para efectuar el cambio.

18. El método de la reivindicación 16 o 17, donde la concentración de la construcción en la suspensión está en el intervalo 0,1 a 10 mg/ml.

19. El método de la reivindicación 16, 17 o 18, donde la puesta en contacto es a una temperatura en el intervalo 2 a 37 ºC.

20. El método de la reivindicación 19, donde la puesta en contacto es a una temperatura en el intervalo 2 a 25 ºC.

21. El método de la reivindicación 20 donde la puesta en contacto es a una temperatura en el intervalo 2 a 4 ºC.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, donde F es GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ o Galα1-3(Fucα1-2)Galβ.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, donde la célula es un glóbulo rojo.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, donde F es un ligando para una molécula de unión donde la presencia de la molécula de unión es diagnóstico de una afección patológica.

25. El método según la reivindicación 24, donde F es un ligando para una inmunoglobulina.

26. Una **célula** que incorpora una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

27. La célula de la reivindicación 26, donde la célula es un glóbulo rojo.

28. Un **kit** que comprende una suspensión en una solución de suspensión de células de la reivindicación 26.

29. El kit según la reivindicación 28, donde la solución de suspensión está sustancialmente libre de lípido.

30. Una **preparación farmacéutica** que comprende una preparación o solución secada de una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

31. La preparación farmacéutica según la reivindicación 30, donde la preparación está en una forma para administración por inhalación.

32. La preparación farmacéutica según la reivindicación 30, donde la preparación está en una forma para administración por inyección.

33. Una **preparación farmacéutica** que comprende las células de la reivindicación 26.

34. La preparación farmacéutica de la reivindicación 33, donde la preparación está en una forma para administración por inhalación.

35. La preparación farmacéutica de la reivindicación 33, donde la preparación está en una forma para administración por inyección.

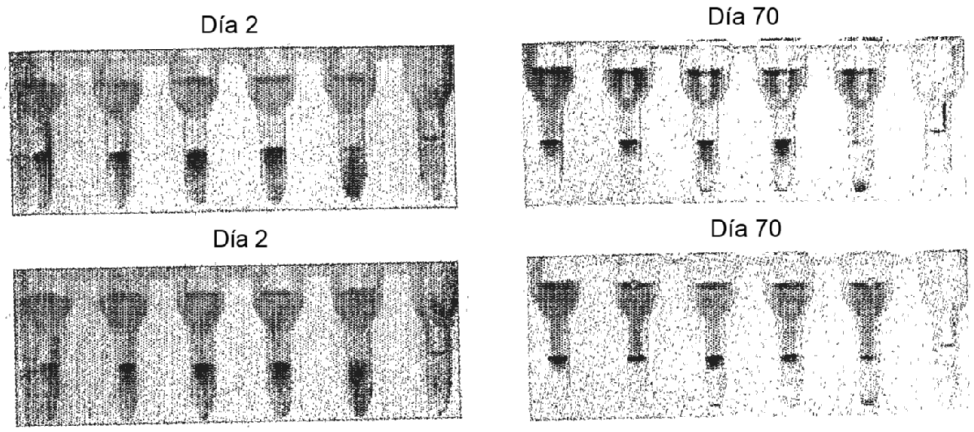


FIGURA 1

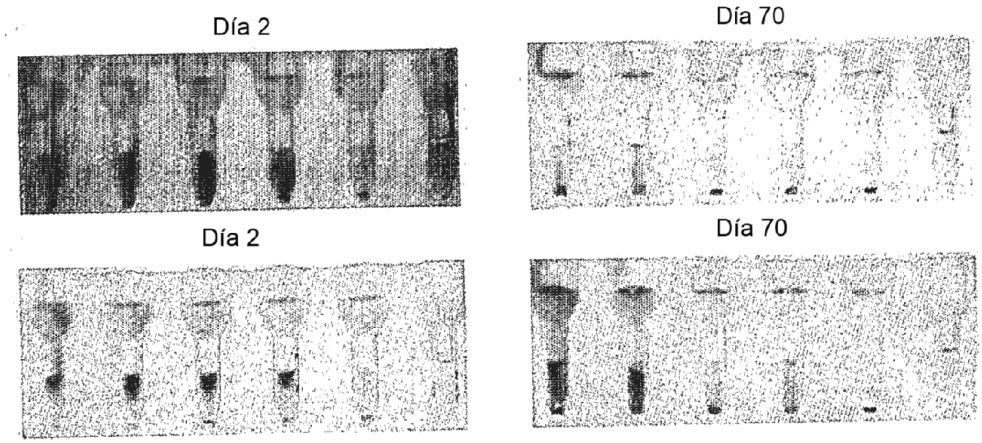


FIGURA 2

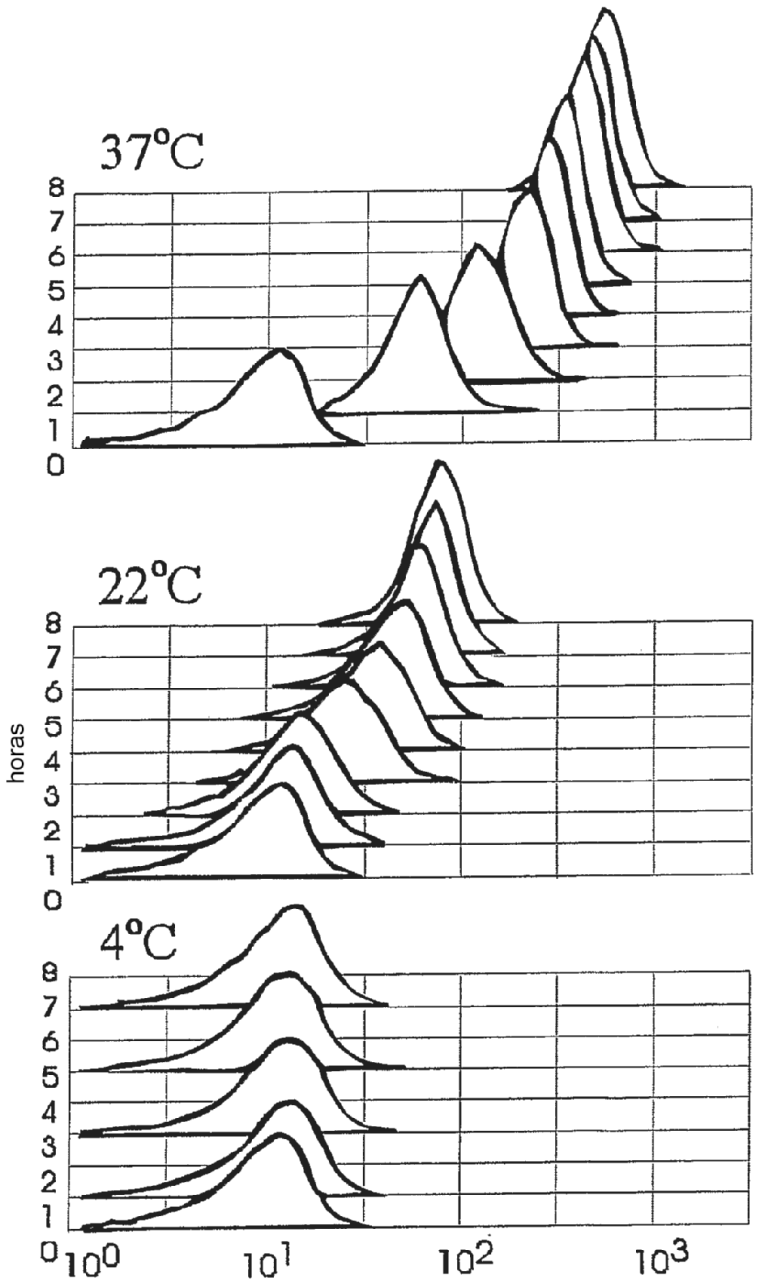


FIGURA 3

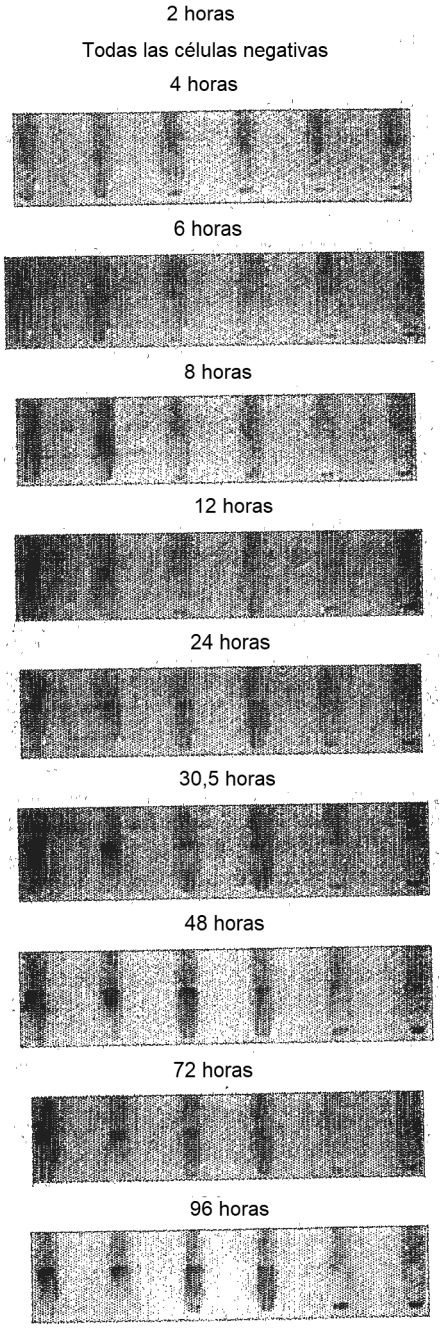

2 horas
Todas las células negativas
4 horas
6 horas
8 horas
12 horas
24 horas
30,5 horas
48 horas
72 horas
96 horas

FIGURA 4

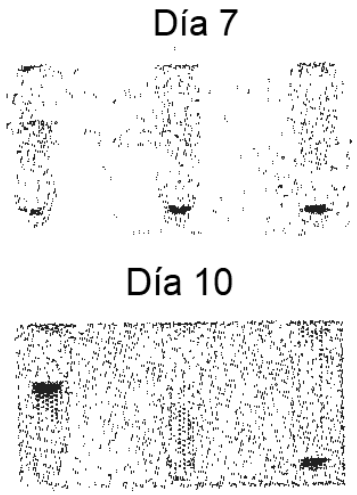


FIGURA 5

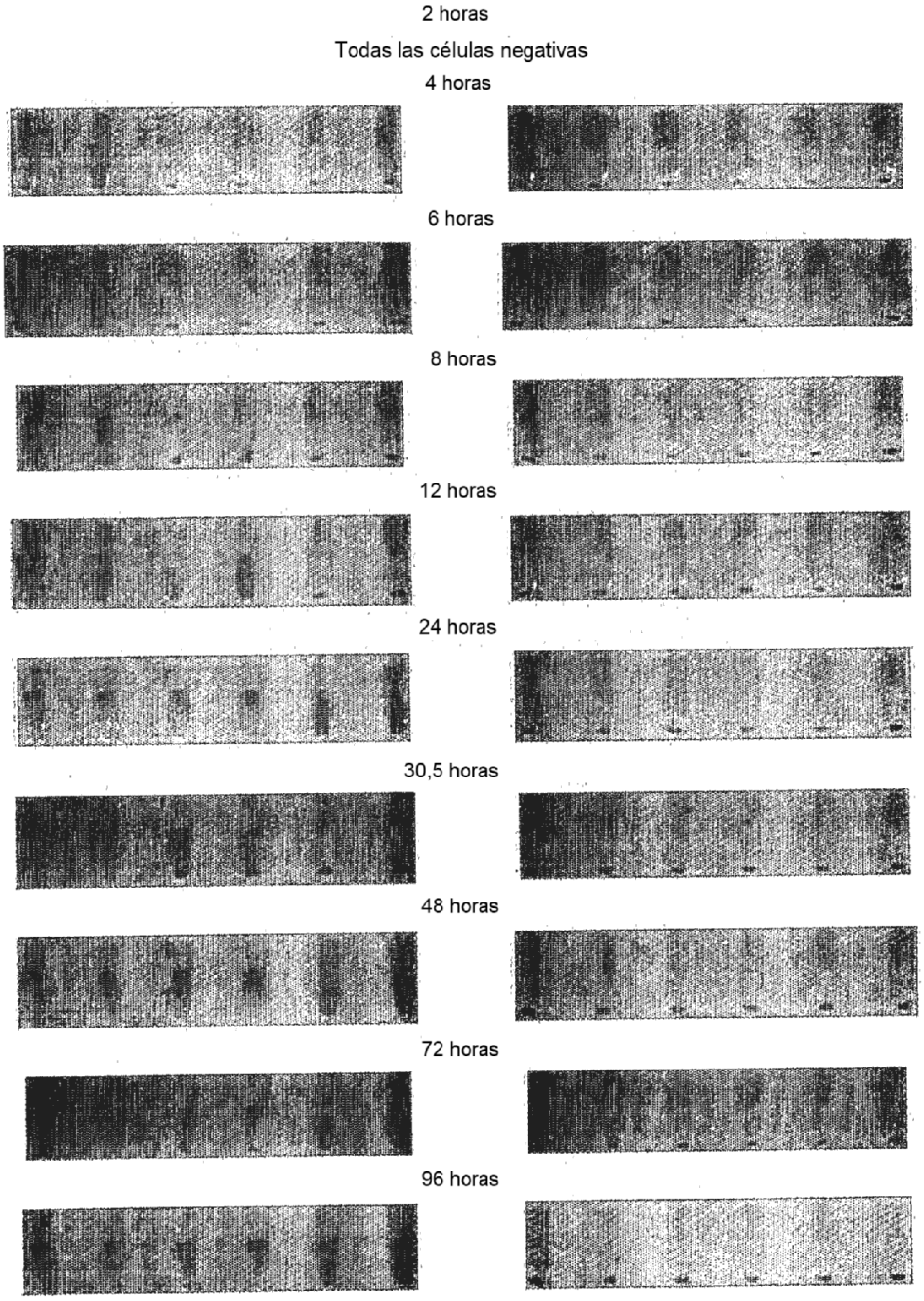
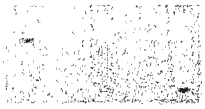

2 horas
Todas las células negativas
4 horas
6 horas
8 horas
12 horas
24 horas
30,5 horas
48 horas
72 horas
96 horas

FIGURA 6

Día 7



Día 10

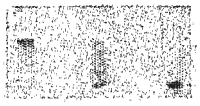
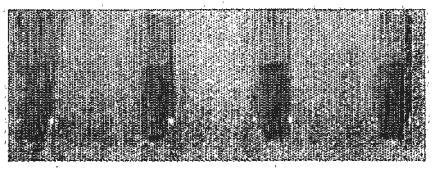


FIGURA 7

Día 1



Día 5

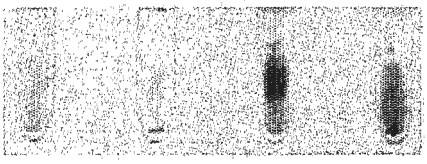


FIGURA 8

Día 8

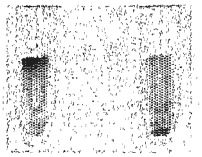


FIGURA 9

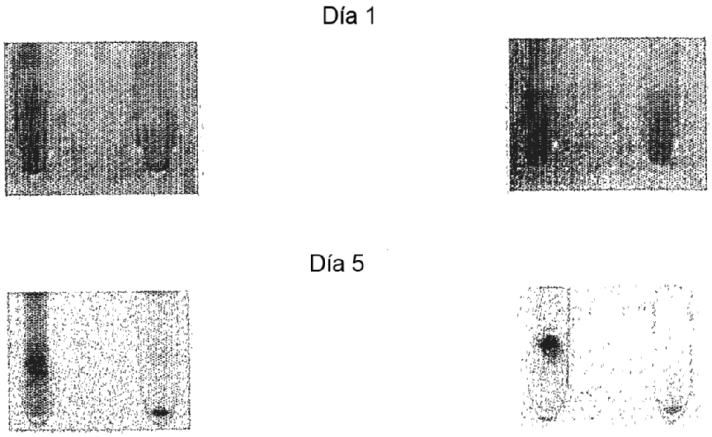


FIGURA 10

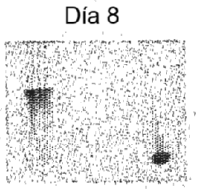


FIGURA 11

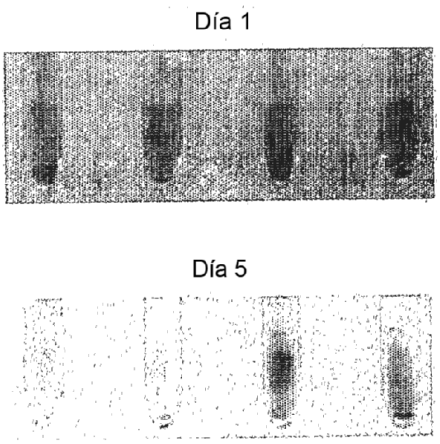


FIGURA 12

Día 8

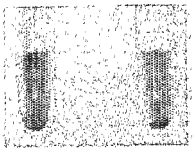
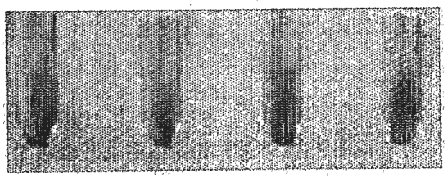


FIGURA 13

Día 1



Día 5

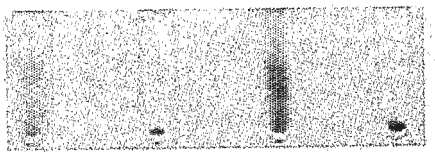


FIGURA 14

Día 8

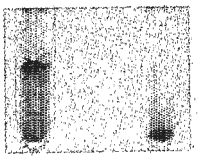


FIGURA 15

Día 1

Día 5

FIGURA 16

Día 8

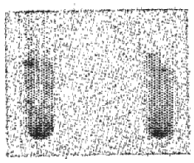
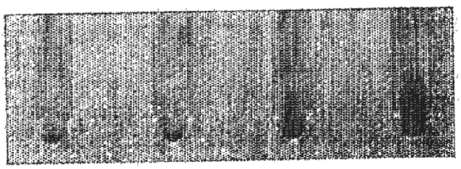


FIGURA 17

Día 1



Día 1

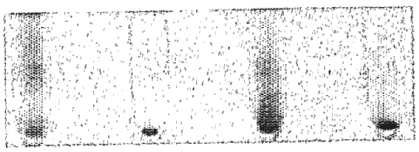


FIGURA 18

Día 8

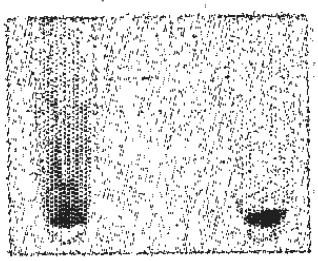


FIGURA 19