



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

19044

UNIDO Project DP/RLA/83/003

Massive Production of Monoclonal Antibodies

Contract No. 89/69

FINAL REPORT

-of the first period-

(Language: Spanish)

by

Bruno Lomonte

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,  
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

## RESUMEN

Como parte de las iniciativas para desarrollar la tecnología de hibridomas/anticuerpos monoclonales, el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica ha equipado un laboratorio para iniciar esta línea de trabajo. En su primera fase, se ha introducido la capacidad para generar y mantener hibridomas. La segunda fase incluirá el aprendizaje y entrenamiento para la producción masiva de anticuerpos monoclonales de interés, seguida del equipamiento necesario y de la ejecución de la producción.

Como línea inicial de trabajo, el Instituto Clodomiro Picado se ha interesado en generar y caracterizar un grupo de anticuerpos monoclonales contra las principales toxinas causantes de necrosis muscular en los envenenamientos por la serpiente Bothrops asper. El interés radica en las posibilidades de utilizar anticuerpos monoclonales para mejorar la potencia neutralizante de los sueros antiofídicos convencionales en lo que respecta al efecto mionecrótico. El informe anterior describió la caracterización de las propiedades neutralizantes del anticuerpo H305G8G1. Dentro de esta misma línea, hemos incluido en las prioridades un segundo tema, la generación de anticuerpos contra toxinas del género Micrurus (serpientes corales). El problema de los envenenamientos por Micrurus podría ser un caso muy apropiado para la aplicación de anticuerpos monoclonales en terapia, dado que la heterogeneidad de las toxinas responsables de los efectos clínicos importantes del veneno, como la

neurotoxicidad, es considerablemente menor que en el caso de los venenos botrópicos. Esta opinión ha sido señalada recientemente por otros investigadores como Theakston (Ref.2). Recientemente se ha iniciado la generación de hibridomas contra el veneno de Micrurus y hasta la fecha se han obtenido 4 anticuerpos monoclonales, los cuales están en fase de caracterización, en cuanto a su isotipo, especificidad, reacciones cruzadas y propiedades neutralizantes. A la vez, se está trabajando en la generación de más hibridomas anti-Micrurus.

## INTRODUCCION

La tecnología de hibridomas/anticuerpos monoclonales ha aportado una serie de aplicaciones importantes en investigación, diagnóstico y terapéutica de enfermedades humanas y de animales. En Costa Rica, al igual que en otros países pequeños de Latinoamérica, esta tecnología está apenas dando sus primeros pasos. Se ha iniciado la generación de hibridomas en algunos centros de investigación universitarios, entre ellos el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica. Se cuenta con personal científico capacitado y con la infraestructura para producir anticuerpos monoclonales en pequeña escala (a nivel de miligramos) en fluido ascítico de ratones, pero aún no se ha desarrollado la capacidad para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales de interés en diversos campos. Se espera que gracias a la ayuda obtenida a través de este proyecto, y al asesoramiento técnico-científico por parte de los Centros de Referencia en Cuba y Brasil, se adquiera la capacitación para ejecutar la producción masiva de anticuerpos monoclonales a mediano plazo, una vez logrado el equipamiento mínimo indispensable.

El Instituto Clodomiro Picado (ICP) es un centro de investigación y de producción de sueros hiperinmunes antiofídicos, de la Universidad de Costa Rica. Actualmente se planea iniciar la producción en otras líneas afines, tales como suero antitetánico, productos hemoderivados, y reactivos para

inmunodiagnóstico.

La línea inicial de interés en el ICP en el campo de la tecnología de hibridomas ha sido el desarrollar anticuerpos monoclonales que neutralicen actividades tóxicas específicas de los venenos de serpiente, especialmente aquellas actividades que son menos eficientemente neutralizadas por los antisueros policlonales convencionales, como lo es el caso del efecto miotóxico (Ref.1). En la actualidad se está estudiando en detalle la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-miotoxina, para determinar su potencial como agentes terapéuticos que refuercen la eficiencia anti-miotóxica de los sueros antiofídicos. Estos estudios servirán de base para determinar las posibilidades de una producción a nivel industrial de estos y otros anticuerpos neutralizantes de toxinas en el futuro.

Un segundo objetivo dentro de esta misma línea es desarrollar anticuerpos monoclonales contra las neurotoxinas de serpientes de coral, por las dificultades en la preparación de antivenenos convencionales en este campo, y el potencial terapéutico que ofrecerían los monoclonales. Por otra parte, se planea (febrero 1991) generar anticuerpos monoclonales contra la subunidad  $\beta$  de la hormona gonadotropina coriónica humana, para desarrollar reactivos de diagnóstico precoz de embarazo nacionales que sustituyan los reactivos importados. En estos dos últimos proyectos se cuenta con el trabajo de tesis de un estudiante de maestría y uno de licenciatura, respectivamente.

## RESULTADOS

En este informe se incluyen los datos del informe parcial presentado anteriormente, sumados a los datos nuevos.

## A. Anticuerpos monoclonales anti-miotoxina:

De siete anticuerpos monoclonales anti-miotoxina obtenidos, tres poseen capacidad neutralizante de la acción miotóxica (MAbs-3, 4 y 5) en técnicas de preincubación *in vitro* y posterior administración intramuscular en ratones. De éstos, se eliminó del estudio el MAb-5 por ser de la clase IgM, y se prosiguió con la caracterización de los dos restantes, los cuales son IgG<sub>1</sub>. Estos dos anticuerpos monoclonales han sido estudiados en cuanto a su capacidad para reconocer distintas variantes (isoformas) de la miotoxina en el veneno crudo, así como en cuanto a su capacidad para neutralizar la acción miotóxica de las toxinas purificadas y del veneno crudo. Los resultados parciales se pueden resumir como sigue:

- (a) Tanto el MAb-3 como el MAb-4 neutralizan la miotoxina I.
- (b) La miotoxina II es neutralizada por el MAb-3 pero no completamente por el MAb-4, el cual posee una unión débil hacia esta variante.
- (c) Ambos anticuerpos neutralizan completamente la acción miotóxica del veneno crudo de Bothrops asper, aunque el MAb-3 muestra una mayor potencia neutralizante que el MAb-4.
- (d) Al comparar la eficiencia neutralizante del MAb-3 con

respecto a anticuerpos policlonales equinos anti-miotoxina (aislados por afinidad a partir del suero antiofídico comercial), se encuentra una potencia ligeramente mayor del monoclonal.

El estudio de la potencia neutralizante in vivo (envenenamiento experimental seguido de la administración de anticuerpo monoclonal) es la fase final que falta, para tener una caracterización completa del anticuerpo H305G8G1. El estudio sufrió un retraso significativo, dado que la colonia de ratones BALB/c utilizada para la generación de ascitis sufrió una contaminación genética que pasó desapercibida inicialmente. Debido a esto, varios intentos de producción del anticuerpo monoclonal fueron infructuosos, a lo largo de varios meses, hasta que se detectó el problema. La colonia de animales tuvo que iniciar de nuevo, lo que está tomando algún tiempo. Recientemente se logró obtener un nuevo lote del anticuerpo monoclonal H305G8G1 en los nuevos ratones BALB/c, con el cual se planea completar el estudio y tomar una decisión con respecto al verdadero potencial de este anticuerpo.

#### B. Anticuerpos anti-Micrurus:

Se realizaron dos fusiones para generar hibridomas anti-Micrurus. Este veneno presenta el problema de ser muy tóxico y sus neurotoxinas poseen una inmunogenicidad relativamente baja, dado su peso molecular bajo. Esto dificultó la inmunización ya



que durante varios intentos los animales murieron por la toxicidad del antígeno. Sin embargo, se encontraron condiciones apropiadas para un esquema de inmunización. Se han obtenido hasta la fecha 4 hibridomas específicos para el veneno, y se planea realizar más fusiones. Los anticuerpos deberán ser caracterizados y probados en cuanto a capacidad neutralizante. Para esto se cuenta con la elaboración de una tesis de maestría en un programa conjunto entre el ICP y el Instituto Karolinska en Suecia. Las siguientes fusiones se realizarán con fracciones neurotóxicas del veneno, para aumentar las probabilidades de obtener anticuerpos neutralizantes de la neurotoxicidad. Los 4 anticuerpos obtenidos están siendo probados en cuanto a su reactividad frente a los venenos de 17 especies distintas del género Micrurus halladas en Latinoamérica, y los resultados preliminares indican que reconocen componentes comunes a la gran mayoría de los venenos de este género.

## CONCLUSIONES

Los avances de este proyecto, en lo que se refiere a trabajo de laboratorio, se resumen a la caracterización de la capacidad neutralizante de anticuerpos anti-miotoxina de la serpiente Bothrops asper, así como a la generación y caracterización de nuevos hibridomas contra toxinas de serpientes Micrurus. En cuanto al objetivo central y global del proyecto, referente a aprender la tecnología de producción masiva de los Centros de Referencia, consideramos que estamos avanzando gradualmente y positivamente, al completarse para esta fecha los dos primeros entrenamientos en Cuba y Brasil, respectivamente. En ese sentido, el conocimiento o "know-how" de esta tecnología está siendo adquirido en la medida que este es enseñado en dichos centros. Un punto aparte será la financiación para poder ejecutar eventualmente las metodologías aprendidas en los centros de referencia, debido a su elevado costo.

## REFERENCIAS

1. Lomonte, B. & Kahan, L. (1988) Production and partial characterization of monoclonal antibodies to Bothrops asper (terciopelo) myotoxin. Toxicon 26, 675-689.
2. Theakston, R.D.G. (1989) Snake venoms in science and clinical medicine. 2. Applied immunology in snake venom research. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 83, 741-744.