



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th 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 for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

19928

sp
proyecto

UNIDO Project DP/RLA/83/003

Massive Production of Monoclonal Antibodies

Contract No. 91/087G

FINAL REPORT

(Language: Spanish)

by

Bruno Lomonte

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,

Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

RESUMEN

El trabajo en el área de la tecnología de hibridomas y anticuerpos monoclonales que se ha venido desarrollando en el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, en los últimos años, se ha centrado en la obtención y caracterización de anticuerpos murinos contra toxinas ofídicas de relevancia biomédica. Dichos anticuerpos encierran un interés tanto desde un punto de vista básico (como herramientas para el estudio de las toxinas y sus acciones), como aplicado, dado su potencial neutralizante y por ende terapéutico. En el segundo período de este proyecto patrocinado por PNUD se trabajó a dos niveles: como objetivo principal, a nivel de la adquisición de conocimientos sobre la producción masiva a través del entrenamiento de personal en los centros especializados de referencia; y a la vez, como objetivo secundario, a nivel de la preparación y caracterización de nuevos anticuerpos monoclonales contra toxinas. Aunque por distintas razones ajenas a nuestro control que se detallan en el presente informe final, el entrenamiento de personal solo pudo ser aprovechado parcialmente, se pudo avanzar en el trabajo de nuevos hibridomas y la caracterización de sus anticuerpos monoclonales. Dicho trabajo, con la ayuda del presente proyecto, ha permitido mantener vigente la capacidad tecnológica básica para la producción de anticuerpos monoclonales en Costa Rica, a escala de laboratorio. El alto costo de la producción masiva es el principal obstáculo para su puesta en marcha en nuestro medio.

INTRODUCCION

La tecnología de hibridomas/anticuerpos monoclonales es aún bastante incipiente en Costa Rica. Aunque se cuenta con suficientes recursos humanos formados en universidades de países desarrollados, y con entrenamiento específico en las tecnologías específicas para preparar hibridomas y anticuerpos monoclonales, el alto costo en general ha limitado en gran medida la expansión de esta área biotecnológica en nuestro país. El Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica es uno de los pocos centros estatales que ha abordado esta importante tecnología, iniciando en 1988 una inversión para equipar y mantener un pequeño laboratorio dedicado a dicha labor. La principal línea de trabajo ha sido la producción de anticuerpos monoclonales contra toxinas de serpientes, como se describió en el informe anterior. El personal científico y la infraestructura están capacitados 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 los mismos. Gracias al aporte fundamental de este proyecto regional, y a la colaboración de los centros de referencia en Brasil y Cuba, se ha iniciado la capacitación del personal para los métodos de producción masiva. En estos momentos se cuenta con un investigador que recibió el entrenamiento citado en Brasil.

Como información introductoria, se puede citar que el Instituto Clodomiro Picado (ICP) es un centro estatal de investigación y de producción de sueros hiperinmunes antiofídicos, perteneciente a la Universidad de Costa Rica. En la actualidad el ICP se encuentra en las fases iniciales para establecer la producción en ciertas líneas afines, basadas en la preparación de sueros hiperinmunes u otras preparaciones de anticuerpos para uso terapéutico. Entre estas está

el suero antitetánico, junto con la producción de toxoide tetánico que conlleva el elaborar dicho producto.

En el campo de la tecnología de hibridomas, el interés del ICP ha sido el desarrollar anticuerpos monoclonales que neutralicen actividades tóxicas específicas de los venenos de serpiente, en especial aquellas actividades que son menos eficientemente neutralizadas por los antisueros policlonales convencionales, como lo es el caso del efecto miotóxico (Referencia 1). El estudio de la capacidad neutralizante de los anticuerpos monoclonales es importante como la base para determinar las posibilidades de una producción a nivel industrial de estos y otros anticuerpos neutralizantes de toxinas en el futuro (Referencias 3 y 4).

Una segunda línea dentro de este campo 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. A continuación se resume el estado de los principales logros en estas áreas, así como el resultado de los entrenamientos para la capacitación y formación de recursos humanos en los métodos de producción masiva de anticuerpos monoclonales.

RESULTADOS

I.Capacitación de los recursos humanos:

En este objetivo del proyecto, puede decirse que los resultados han sido solo parcialmente exitosos, debido a problemas de continuidad y retención del personal, lo que a su vez llevó a

problemas adicionales que se presentaron en el último curso o entrenamiento en que se participó en Brasil durante 1991. El primer entrenamiento se recibió en Cuba (primer año del proyecto), pero desafortunadamente el investigador seleccionado para asistir dejó de trabajar para nuestra Universidad algún tiempo después. Debido a esto, el segundo período de entrenamiento fue recibido en Brasil por otro investigador nuestro, establecido desde varios años. Dicho entrenamiento, al igual que el anterior, fueron considerados excelentes, como se desprende de los respectivos informes de dicho período. Sin embargo, en el segundo período se presentó el problema de que no podía asistir el mismo investigador a Brasil, por razones personales muy serias. Ante esto, se seleccionó otro investigador para asistir, lo cual causó malestar por parte de los encargados del entrenamiento en Brasil. Ya estando dicho investigador en Brasil, y ante los problemas planteados por los responsables del curso, se sugirió utilizar el período de entrenamiento para adquirir las bases tecnológicas para la producción de toxoide tetánico y suero antitetánico en el mismo Instituto Butantán. De tal manera que principalmente en la última fase de capacitación, hubo problemas que motivaron este cambio, ante la inflexibilidad de los encargados del entrenamiento.

II. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra las fosfolipasas miotóxicas del veneno de *Bothrops asper*:

En esta línea, se completó el estudio de la capacidad neutralizante de 2 anticuerpos murinos (MAb-3 y MAb-4), tanto hacia el efecto miotóxico inducido por las toxinas purificadas, como por el veneno completo. La información obtenida se detalla en un artículo recientemente publicado (Referencia 2), el cual se adjunta en el presente informe (Apéndice). Ambos

anticuerpos poseen un potencial terapéutico importante, dada su alta eficiencia neutralizante en comparación con anticuerpos policlonales, aunque dados los altos costos de producción industrial (Referencia 3) su uso en la práctica no se vislumbra por ahora.

III. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra el veneno de *Micrurus nigrocinctus*:

A los 4 hibridomas obtenidos hasta el momento del último informe presentado, se le agregan otros 6 obtenidos recientemente. Todos estos anticuerpos monoclonales reconocen componentes del veneno de *Micrurus nigrocinctus*, la principal especie de serpiente coral en Centroamérica. Los anticuerpos se han venido caracterizando gradualmente, y algunos reconocen también a numerosas especies de *Micrurus* del continente. La especificidad, patrón de reactividad cruzada, y capacidad neutralizante están aún siendo estudiadas en el presente momento, aunque la información obtenida hasta la fecha será enviada a publicación (se adjunta los Abstracts en el Apéndice).

CONCLUSIONES

El proyecto ha permitido la capacitación de nuestros recursos humanos a nivel básico en cuanto a la implementación de varios métodos para producir masivamente anticuerpos monoclonales. Si bien dichos métodos no pueden ser puestos en práctica de inmediato, debido a limitaciones económicas de nuestro medio, el conocimiento necesario para una futura implementación se posee. A la vez, el proyecto nos ha permitido continuar trabajando con la

línea de la tecnología de hibridomas y anticuerpos monoclonales, a nivel de la generación de nuevos hibridomas, la producción de cantidades pequeñas de sus respectivos anticuerpos monoclonales a nivel del laboratorio de investigación, y la caracterización de sus propiedades básicas y neutralizantes hacia diversas toxinas ofídicas. Consideramos que dicha actividad es relevante en términos del desarrollo tecnológico y científico de nuestro país, en donde la citada tecnología se encuentra aún en fases muy incipientes.

REFERENCIAS

1. Lomonte, B. & Kahan, L. (1988) Production and partial characterization of monoclonal antibodies to Bothrops asper (terciopelo) myotoxin. Toxicon 26, 675-689.
2. Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Ramírez, M. & Díaz, C. (1992) Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake Bothrops asper by monoclonal antibodies. Toxicon 30, 239-245.
3. Ménez, A. (1991) Immunology of snake toxins. In: Snake Toxins (Harvey, A., Ed.), p.35. New York: Pergamon Press.
4. 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.

APENDICE

1. Informe del entrenamiento en Instituto Butantán, Sao Paulo, Brasil, Julio-Setiembre de 1991, por Shirley Quirós Achí.
2. Artículo publicado sobre los anticuerpos monoclonales contra miotoxinas de Bothrops.
3. Abstract de los manuscritos en preparación sobre los anticuerpos monoclonales contra toxinas de Micrurus.

INFORME FINAL

**ENTRENAMIENTO EN PRODUCCION DE TOXINA, TOXOIDE TETANICO Y SUERO
ANTITETANICO**

**INICIO DEL ENTRENAMIENTO SOBRE PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES**

PARTICIPANTE

**SHIRLEY QUIROS ACHI
INSTITUTO CLODOMIRO PICADO
FACULTAD DE MICROBIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

DESARROLLADO EN

**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA, INSTITUTO BUTANTAN, BRASIL
(02/JUL/91 - 11/JUL/91)**

**SECCION DE TETANO, SECCION DE FRACCIONAMIENTO DE SUERO
SECCION DE CONTROL DE CALIDAD, INSTITUTO BUTANTAN, BRASIL
(15/JUL/91 - 06/SET/91)**

Programa del proyecto No. DP/RLA/83/003, Producción Masiva de Anticuerpos Monoclonales, patrocinado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).

Investigador responsable del entrenamiento:

Ana María Moro-Furlani, PhD, Sección de Biotecnología

En la sección de Biotecnología del Instituto Butantán se presentaron para mí dos circunstancias que me impidieron cumplir con lo programado para el entrenamiento de producción masiva de anticuerpos monoclonales. Estas circunstancias son las siguientes:

1. En el grupo de estudiantes programado para el período de julio, agosto y setiembre, no se había incluido al estudiante de Costa Rica.

2. Yo no había recibido la capacitación del curso anterior en Brasil, por lo que la Dra Ana María Moro consideró que este entrenamiento era básico para participar en la siguiente etapa.

Lo anterior culminó en una reunión en la que participamos La Dra Moro, el Dr José María Gutiérrez (Director del Instituto Clodomiro Picado, quien se encontraba en el Instituto Butantán) y yo. En dicha reunión (11/JUL/91) se decidió, de común acuerdo entre las partes, que durante mi estadía en el Instituto Butantán, recibiera un entrenamiento en la producción de toxina y toxoide tetánico, y suero anti-tetánico, estas actividades más afines con mi trabajo en el Instituto Clodomiro Picado.

A continuación expongo un resumen de las actividades en las que participé en el Centro de Biotecnología, del 02/JUL/91 al 11/JUL/91.

1. Estudio del folleto del curso post-congreso: Tecnología de obtención y producción de anticuerpos monoclonales murinos. Cuba, 1989.

2. Mantenimiento, propagación e inoculación de un hibridoma murino en cavidad ascítica.

3. Propagación de células de hibridoma en botellas de cultivo celular para la preparación de inóculos.

Hasta este punto fue que se decidió con la encargada del entrenamiento, Dra Moro, de pasar a la sección de tétanos del mismo instituto.

Entrenamiento en producción de toxina, toxoide tetánico y suero antitetánico.

Investigador responsable del entrenamiento:

Dra Hisako Gondo H.

Informe:

SECCION DE CONCENTRACION DE SUEROS:

Estas observaciones son hechas con base en el fraccionamiento de un suero anti-botrópico, pero el mismo proceso se utiliza para sueros anti-diftérico, anti-crotálico y anti-tetánico.

El proceso consiste básicamente en lo siguiente:

Al plasma hiperinmune previamente diluido para una concentración de proteínas entre 4 y 5 g/dl, se le agrega sulfato de amonio puro hasta alcanzar una concentración del 33% y se le ajusta el pH a 6,9-7,0. En estas condiciones, precipitan las globulinas y el fibrinógeno, pero no la albúmina, la cual se descarta. Es importante que el producto contenga la menor cantidad posible de albúmina equina porque ésta podría generar problemas alérgicos en los pacientes.

El precipitado se disuelve hasta alcanzar una concentración de proteínas y sulfato de amonio alrededor de 4% y 8%, respectivamente. La temperatura y el pH se ajustan adecuadamente para la pepsinización. La pepsina es una enzima que cataliza la digestión de los anticuerpos liberando el fragmento Fc por lo que pierden la capacidad de activar al sistema de complemento. El resultado es una molécula dividida en dos porciones: una fracción inactiva (termocoagulable) y una activa (termoresistente). Aplicando este procedimiento, el rendimiento baja un poco pero la pureza del producto es mayor. El reajuste del pH a 4,5 posterior a la pepsinización cumple la función de detener la actividad de la enzima.

La concentración de sulfato de amonio se ajusta ahora al 11,3% para precipitar el fibrinógeno. Se agrega tolueno hasta alcanzar una concentración de 0,3% para facilitar la precipitación de lípidos juntamente con proteínas inespecíficas. Hasta aquí todo el proceso se lleva a cabo en un sistema cerrado y automatizado.

El pH se ajusta a un valor de 6,8-6,9 y este es el valor del pH del producto final (una antitoxina es más estable en cuanto a su actividad, cuanto más ácido es el pH del medio en el que se mantenga). Al agregar sulfato de amonio para alcanzar una concentración del 17,6% termina de precipitar el fibrinógeno. Las globulinas que se encuentran en el sobrenadante, se concentran y purifican por medio de una ultrafiltración. El ajuste de fenol como

preservante, de cloruro de sodio para mantener la osmolaridad, la dilución adecuada para alcanzar la concentración de proteínas y el nivel de potencia especificado para el producto, se hace después de la ultrafiltración.

La planta de producción de la sección de fraccionamiento de sueros, consiste en un sistema cerrado y automatizado. Desde un panel de controles, se pueden mantener estabilizados la temperatura y el pH del material en proceso. El tanque utilizado para la pepsinización posee doble camisa de acero inoxidable con el fin de poder circular agua de forma inmediata a la temperatura en que se necesite mantener el material en proceso. Un destilador de agua instalado en la misma planta facilita el acceso a una fuente de agua para el fraccionamiento y la dilución del producto.

Control de calidad:

Durante el proceso de producción, la técnica de electroforesis aplicada a los diferentes precipitados y sobrenadantes ofrece una clara idea del grado de calidad que va alcanzando el producto. Pruebas de esterilidad y de hemólisis radial son realizadas al plasma hiperinmune que entrará al proceso con el fin de determinar si el plasma está libre de microorganismos contaminantes en el primer caso y si alcanza el nivel requerido de anticuerpos para entrar al proceso en el segundo caso. La concentración de proteínas, sulfato de amonio y el pH se realizan para ajustar a los valores requeridos según la etapa del proceso en la que se encuentre el material.

Una muestra del producto a granel es tomada en forma aséptica para hacer las pruebas pertinentes. Al producto final se le hacen los siguientes análisis:

- Determinación de pH
- Concentración de sulfato de amonio
- Concentración de proteínas
- Prueba de pirógenos
- Prueba de esterilidad
- Sólidos totales
- Nitrógeno total y no proteico
- Potencia
- Determinación de fenol
- Aspecto
- Volumen medio
- Concentración de cloruro de sodio

El procedimiento de los análisis está basado en la Brazilian Pharmacopeia (1959). El proceso de fraccionamiento utilizado en el Instituto Butantan es similar al empleado en el Instituto Clodomiro Picado, con algunas diferencias. La principal de ellas es que en el Butantan pepsinizan el suero e incluyen una precipitación adicional con sulfato de amonio. Otras diferencias son dadas por el equipo utilizado y el tamaño del mismo.

SECCION DE TETANOS:

Para la producción de toxoide tetánico, se parte de un subcultivo puro de una cepa conocida como toxigénica y no esporulante en condiciones normales de laboratorio. Esta cepa se debe mantener a 30°C y se pueden hacer subcultivos puros a partir de ella en caldo de tioglicolato con leche descremada al 2%. Después de dispensar estos subcultivos en ampollas de vidrio y liofilizarlos, se conservan hasta su utilización a la temperatura antes indicada.

La preparación del toxoide tetánico comprende tres etapas básicas:

1. Producción de toxina.
2. Preparación de anatoxina.
3. Preparación de toxoide.

1. Producción de toxina:

La preparación inicial de un inóculo del contenido de una de las ampollas de C. tetani liofilizado en 50 ml de caldo de tioglicolato, es con el fin de preparar un segundo inóculo para el fermentador. Este consiste en la siembra del primer inóculo (una vez revisadas las pruebas de pureza), en 6 litros de caldo tioglicolato. La botella que contiene este material se coloca en una estufa a 34,5°C. El crecimiento típico de C. tetani y las pruebas de pureza indican si se puede utilizar este inóculo para el fermentador.

Para la producción de toxina, se utiliza el medio de cultivo llamado Lathan Muller que tiene como base la digestión trípica de caseína. El medio total consiste en una mezcla de solución de N.Z. Case con varias materias orgánicas e inorgánicas. Un período de 5 días de incubación es el tiempo óptimo para obtener las mejores títulos de toxina tetánica extracelular. Los controles de temperatura, pH, flujo de aire, voltaje y amplitud son estabilizados en el fermentador por medio de un panel de controles.

La separación de la masa bacteriana y el sobrenadante se realiza con filtros de profundidad de 30S y 90S. Al sobrenadante y a una muestra tomada del fermentador al final del proceso en este, se la hacen las siguientes pruebas:

a. Floculación: es una prueba in vitro que define a una toxina por su inmunoreactividad. Consiste en hacer diluciones de una antitoxina patrón y mezclar con una cantidad fija de la toxina de prueba, incubar a 45°C y observar el tiempo y la secuencia de los tubos cuyo contenido floculó primero. El título se expresa en LF/ml.

b. MTV: se utiliza para comprobar si el límite de floculación obtenido fue correcto. Se realiza in vivo generalmente en ratones y el título es una forma de expresar la toxicidad. Debido a que la

prueba de floculación está sometida a algunas variantes es recomendable hacer siempre esta prueba para interpretar correctamente los resultados.

c.DMM: determinando la dosis mínima mortal se obtiene el título de la toxina con respecto a su toxicidad.

d.L+/10: una dosis límite de muerte corresponde a la menor cantidad de toxina que cuando mezclada con 0,1 UI de antitoxina patrón e inoculada en ratones produce la muerte de estos en 96 horas. Es otra forma de caracterizar a la toxina por su toxicidad.

La concentración y diálisis con un UF tiene como objetivo empezar la purificación de la toxina. El siguiente paso, la esterilización da origen a una toxina concentrada y esterilizada que puede utilizarse como antígeno en las etapas tardías de la inmunización de los caballos para la producción de suero antitetánico.

2.Preparación de anatoxina:

La anatoxina tetánica es una toxina tetánica tratada con formaldehído, pierde su capacidad toxigénica pero mantiene su actividad inmunológica. La concentración de formalina que inactiva la toxina es del 1% incubada a 37°C por 30 días. La prueba de toxicidad hecha en cobayos asegura que el material no es tóxico.

Después de la diálisis con un ultrafiltro y una filtración esterilizante, la anatoxina tetánica se titula por floculación y se le aplica la prueba de esterilidad. Se le llama anatoxina a granel.

Todo el proceso de producción de toxina hasta la detoxificación se hace en un laboratorio separado de los demás. La anatoxina a granel puede mezclarse con otros lotes de anatoxina para continuar el proceso de purificación. Este se inicia con la concentración de la anatoxina utilizando un ultrafiltro que consiste de un filtro previo de profundidad y tres de superficie posteriores. Una segunda ultrafiltración se realiza con un "millipore" que posee 10 filtros de superficie de 10000D. Puede trabajarse con una sola ultrafiltración dependiendo del volumen utilizado. Una muestra de este material es tomada para hacer análisis de control de calidad: nitrógeno total y no proteico y floculación.

La anatoxina concentrada se precipita con sulfato de amonio al 33%. Después de la primera centrifugación (25 min a 5000 rpm a 0°C), se trata de recuperar todo el precipitado posible porque en él se encuentra la anatoxina. Después de disolverlo con agua, se hace la segunda centrifugación (90 min a 8000 rpm a 0°C) y esta vez se recupera el sobrenadante y se desprecia la masa. El proceso de diálisis con el ultrafiltro concentra las proteínas y depura el concentrado de sulfato de amonio y otras impurezas. Después de este

proceso, se analiza el producto para nitrógeno total, nitrógeno no proteico y floculación. Con una columna de Sephadex G-50 se purifica aún más la anatoxina, mejorando el aspecto visual de la misma en cuanto a coloración.

Después de una dilución hecha para que quede con 500 Lf/ml, se esteriliza al material con un filtro. Al producto se le llama anatoxina tetánica en proceso a granel. Esta puede utilizarse como antígeno al inicio de los esquemas de inmunización para suero antitetánico. La sección de control de calidad toma una muestra para análisis químico y biológico del producto. Una vez aprobados los resultados se le llama: anatoxina tetánica acabada a granel.

3. Preparación de toxoide:

El toxoide tetánico es una anatoxina tetánica acabada a granel, diluída, adsorbida y depositada en un mismo recipiente y con las características de calidad dentro de los límites establecidos. Todo el proceso se hace en forma estéril. Consiste en agregarle a la anatoxina concentrada solución salina, timerosal como preservante e hidróxido de aluminio como adyuvante en cantidad suficiente para alcanzar los valores especificados. Todos estos reactivos son sometidos a los análisis pertinentes de control de calidad antes de ser utilizados. Con cada dosis de toxoide tetánico se suministran 7,5 Lf en un volumen de 0,5 ml.

PREPARACION DE ANTIGENOS:

La Sección de Tétanos recibe de la hacienda una hoja en la cual está especificada la dosis que debe recibir cada caballo de acuerdo con el esquema de inmunización. El cloruro de calcio, una vez disuelto se agrega en forma estéril a la toxina o a la anatoxina según se requiera. Se envasa en botellas ámbar de vidrio y una vez tapadas se guardan en refrigeración hasta ser utilizadas.

INMUNIZACIONES:

El inicio de un esquema de inmunizaciones para un caballo se hace con anatoxina acabada a granel y las inmunizaciones posteriores se hacen con toxina concentrada y esterilizada. Todas las reinmunizaciones se hacen con toxina. Se han probado varios esquemas de inmunización y con algunos se obtienen mejores resultados. Uno de los que han dado buenos resultados tiene una duración de aproximadamente 3 meses.

SECCION DE CONTROL DE CALIDAD

En esta sección se realizan los análisis de los productos finales y las pruebas pertinentes durante los procesos de producción que se realizan en el Instituto Butantán. Los que corresponden a la producción de toxoide tetánico son los siguientes:

ANALISIS FISICOQUIMICOS.

1. Determinación de timerosal.

Método espectrofotométrico. El fundamento es el siguiente: una mezcla digestiva destruye la materia orgánica para liberar el mercurio del timerosal. Este se pone en contacto con la ditizona y se obtiene un producto de color azul cuya máxima absorbancia es a 490 nm. La concentración de mercurio es directamente proporcional a la intensidad del color del producto de la reacción.

2. Determinación de nitrógeno total.

Método: semi-micro Kjeldahl. Todo el nitrógeno presente en la muestra es convertido a sulfato de amonio por la acción de una mezcla digestiva y calor en presencia de sulfato de potasio y sulfato de cobre como catalizadores. En la destilación, por el exceso de NaOH, el sulfato de amonio se descompone liberando todo el amonio. Este reacciona con ácido bórico para formar borato de amonio el cual es titulado con HCl 0,02 N utilizando como indicador rojo de metilo y azul de metileno. Para la determinación de nitrógeno no proteico, antes de la digestión se le hace a la muestra un filtrado libre de proteínas, y al filtrado se le aplica el mismo procedimiento anterior.

3. Determinación de formaldehído:

Método espectrofotométrico. El principio de la prueba se basa en la reacción específica del formaldehído con el reactivo de Hantzsch (específico para formaldehído). El resultado es un producto de color amarillo que presenta su máxima absorbancia a 412 nm.

4. Determinación de hidróxido de aluminio:

Método titulométrico. Todo el aluminio presente en la muestra es liberado por la acción de una mezcla digestiva. La adición de EDTA 0,05 M (exceso) produce un color amarillento en el producto de la reacción con el aluminio. La titulación con sulfato de cobre origina un cambio de color a púrpura. Se hace un blanco siguiendo la misma técnica. La diferencia entre el volumen gastado del blanco y de la muestra está dada por la cantidad de aluminio presente en la muestra.

5. Determinación de cloruro de sodio:

Método titulométrico. El cloruro de sodio presente en la muestra se titula con nitrato de mercurio II en presencia de difenilcarbazona como indicador. Los iones libres de mercurio se combinan con iones cloruro para formar cloruro de mercurio soluble no ionizado. Después de que los iones cloruro han reaccionado con los iones mercurícos, el exceso de mercurio se combina con el indicador mixto difenilcarbazona-azul de bromofenol para formar un complejo azul violeta. El primer cambio de color corresponde al punto final de la titulación.

6. Determinación de sulfato de amonio:

En una reacción con el amonio, el reactivo de Nessler produce un cloide coloreado cuya mayor absorbancia es a 410 nm y que actúa como indicador de la cantidad de amonio presente. Esta reacción es utilizada para examinar muchos materiales biológicos.

PRUEBAS BIOLÓGICAS

Los animales utilizados para realizar las pruebas de control de calidad durante el proceso y el producto final del toxoide tetánico deben ser mantenidos en un ambiente silencioso y con iluminación no muy intensa porque estos factores mal controlados podrían perjudicar la estabilidad de los animales y dar resultados erróneos. Durante el proceso es indispensable realizar varias pruebas in vivo para conocer el grado de calidad que va alcanzando el producto en cuanto a toxicidad, detoxificación y seguridad se refiere. Al producto final se le practican varios ensayos biológicos como son las pruebas de seguridad, de antigenicidad y de toxicidad.

AGRADECIMIENTO

Agradezco al personal del Instituto Butantán que de una u otra forma me ofrecieron su apoyo y dirección de manera tan especial.

Dra Shirley Quirós Acn1, MQC

Encargada, Sección de Control de Calidad
Instituto Clodomiro Picado
Facultad de Microbiología
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica

NEUTRALIZATION OF MYOTOXIC PHOSPHOLIPASES A₂ FROM THE VENOM OF THE SNAKE *BOTHROPS ASPER* BY MONOCLONAL ANTIBODIES

BRUNO LOMONTE,¹ JOSÉ MARÍA GUTIÉRREZ,^{1*} MARGARITA RAMÍREZ² and CECILIA
DÍAZ^{1,2}

¹Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología; ²Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina,
Universidad de Costa Rica, San José; and ³Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico,
LSU, San José, Costa Rica

(Received 30 July 1991; accepted 3 December 1991)

B. LOMONTE, J. M. GUTIÉRREZ, M. RAMÍREZ and C. DÍAZ. Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. *Toxicon* 30, 239-245, 1992.—The neutralization of two myotoxic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops asper*, myotoxins I and II, by two murine monoclonal antibodies is reported. The monoclonal antibodies, MAb-3 and MAb-4, recognize different epitopes of the toxin. Both antibodies completely neutralized myotoxic activity of myotoxin I and crude venom. MAb-3 also completely neutralized myotoxic activity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ isoform, whereas MAb-4 neutralized this toxin only partially. MAb-3 neutralized myotoxin II at a molar ratio of 1:1, showing a higher efficiency than affinity-purified polyclonal antibodies. A dissociation of myotoxic and enzymatic activities of myotoxin I was observed with both monoclonal antibodies.

INTRODUCTION

MANY snake venoms induce necrosis of skeletal muscle due to the action of phospholipases A₂ (PLA₂; MERS and OWENBY, 1990). Myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom is mediated mainly by a group of basic PLA₂s, including myotoxin I (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984), myotoxin II (LOMONTE and GUTIÉRREZ, 1989), myotoxin III (KAISER *et al.*, 1990), and other isoforms, which cross-react antigenically (LOMONTE and KAHAN, 1988). Myotoxins I and III are enzymatically active, whereas myotoxin II is a lysine-49 variant with an extremely low enzymatic activity (0.1% of the active isoform III; FRANCIS *et al.*, 1991). Immunochemical studies of snake venom PLA₂s have shown that PLA₂s isolated from viperids and crotalids appear to constitute a class antigenically different from elapid phospholipases (MIDDLEBROOK and KAISER, 1989; MOLLIER *et al.*, 1989, 1990).

Among a group of murine monoclonal antibodies produced against these myotoxic PLA₂s, one IgM and two IgG1 antibodies showed neutralizing ability for myotoxicity in

*Author to whom correspondence should be addressed.

preliminary screenings (LOMONTE and KAHAN, 1988). Neutralization studies of toxic and/or enzymatic activities of PLAs by monoclonal antibodies might provide useful information on their structure-function relationship, and on the molecular mechanism of neutralization (MÉNEZ, 1985; TRÉMEAU *et al.*, 1986). Also, neutralizing monoclonal antibodies could be of value as potential therapeutic agents. In the present study we characterize the neutralizing ability of two anti-*B. asper* myotoxin monoclonal antibodies of the IgG1 isotype.

MATERIALS AND METHODS

Venom and myotoxins

Bothrops asper venom was obtained from more than 50 specimens from the Atlantic region of Costa Rica, pooled, lyophilized, and stored at -20°C. Myotoxins I and II were isolated from the venom by CM-Sephadex ion-exchange chromatography as described by GUTIÉRREZ *et al.* (1986) and LOMONTE and GUTIÉRREZ (1989), respectively. Myotoxin I was additionally purified by affinity chromatography on a monoclonal antibody-Sepharose column (MAB-4), as described by LOMONTE and KAHAN (1988). Homogeneity of the toxin preparations was determined by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulphate (LAEMMLI, 1970) and by polyacrylamide gel electrophoresis for basic proteins in the presence of urea (TRAI B *et al.*, 1971; LOMONTE and KAHAN, 1988).

Monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies MAB-3 and MAB-4 (both IgG1) were produced by inducing ascites in pristane-primed BALB/c mice injected with hybridomas H305.G8G1 and H305.G9F4, respectively (LOMONTE and KAHAN, 1988). Antibodies were partially purified by precipitation with ammonium sulphate. The antibody concentration of preparations was estimated by densitometric analysis of the monoclonal spike in zone electrophoresis combined with total protein measurement by the biuret method (KABAT and MAYER, 1961). Antibody activity of preparations was assessed by enzyme-immunoassay titrations on microplates coated with myotoxin, as described by LOMONTE *et al.* (1991).

Neutralization of myotoxins

Mixtures of monoclonal antibody and either myotoxin I, myotoxin II, or venom, were incubated at 37°C for 30 min, and then injected i.m. in the gastrocnemius of groups of four mice (18-20 g). Mice injected with phosphate-buffered saline (0.12 M NaCl, 0.04 M phosphate, pH 7.2) were used as controls, whereas mice injected with venom (40 µg) or purified myotoxins (40 µg) alone were utilized as the 100% effect reference. Blood was collected 3 hr after injection by cutting the tip of the tail, and myonecrosis was quantitatively estimated by measuring the plasma creatine kinase (EC 2.7.3.2) activity (GUTIÉRREZ *et al.*, 1980, 1984), using a commercial colorimetric assay (Sigma kit 520, Sigma Chemical Co., U.S.A.). Creatine kinase activity was expressed as units/ml, one unit being defined as the phosphorylation of one nanomole of creatine per min at 25°C. Statistical comparison of quantitative results was performed by the Student's *t*-test. In some experiments mice were sacrificed 4 hr after injection and a sample of injected gastrocnemius muscle was excised, cut into small pieces and processed for histological examination of myonecrosis.

Neutralization of PL4 activity

The ability of monoclonal antibodies to neutralize enzymatic activity of myotoxin I was tested using egg yolk phospholipids as substrate, diluted 1:5 with Tris 0.1 M, CaCl₂ 0.01 M, 1% Triton X-100, at pH 8.5. Myotoxin I was mixed with monoclonal antibodies and incubated for 30 min at 37°C. The mixtures, containing 30 µg

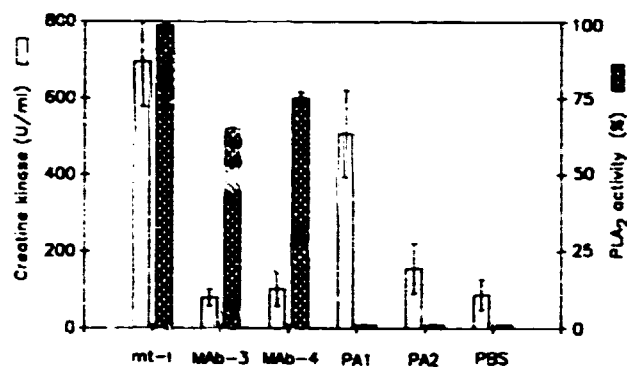


FIG. 1. DISSOCIATION OF MYOTOXIC AND PLA₂ ACTIVITIES OF MYOTOXIN I BY NEUTRALIZATION WITH MONOCLONAL ANTIBODIES.

Mixtures of *B. asper* myotoxin I (mt-I) and monoclonal antibodies MAb-3 or MAb-4 were injected i.m. into groups of four mice for the evaluation of myotoxic activity, and simultaneously tested for PLA₂ activity. Results are shown as mean \pm S.D. ($n = 4$). The 100% enzymatic activity under the assay conditions described was 3.2 μ Fq/mg min⁻¹. The monoclonal antibody:myotoxin molar ratios for MAb-3 and MAb-4 were 3:1 and 1:4, respectively. PA-1: polyvalent antivenom (1 ml antivenom/mg toxin), PA-2: polyvalent antivenom (4 ml antivenom/mg toxin), PBS: phosphate-buffered saline. Creatine kinase values of all groups were significantly different ($P < 0.05$) from the group receiving myotoxin alone. Values of creatine kinase corresponding to MAb-3, MAb-4 and PA-2 were not significantly different ($P > 0.05$) from values corresponding to PBS.

myotoxin, were subsequently incubated with the substrate at 37°C for 20 min. Then, the free fatty acids were extracted and titrated according to the method of Dotti (1956), as previously described (Lowy et al., 1987). As neutralization control, a sample of polyvalent antivenom (Batch 145-P, Instituto Clodomiro Picado, University of Costa Rica) was included.

RESULTS

Neutralization of myotoxicity of myotoxins I and II

When myotoxin I was incubated with either monoclonal antibody MAb-3 or MAb-4, and then injected i.m. into mice, plasma creatine kinase activity values were similar to those observed in control mice injected with saline (Fig. 1), indicating a complete neutralization of myotoxic activity. Polyvalent antivenom also neutralized myotoxic activity of this toxin (Fig. 1). On the other hand, myotoxin II was completely neutralized by MAb-3 (Fig. 2), but only partially (60%) neutralized by MAb-4 (at a molar ratio of antibody to toxin of 1.5:1). Figure 3 shows the neutralization curve of myotoxin II by MAb-3. Myotoxic activity was abolished at molar ratios of antibody:toxin of 1:1 or higher. Histological evaluation of muscle tissue revealed that injection of myotoxin II alone induced necrosis of 40-45% of muscle fibers in the histological slides examined, whereas in muscle injected with phosphate-buffered saline there was no myonecrosis. When myotoxin II was incubated with MAb-3 at a molar ratio of MAb-3:toxin of 0.5:1, there was 40% of myonecrosis, whereas at ratios of 1:1, 2:1 and 3:1 myonecrosis was totally neutralized, as there were no necrotic fibers. On the other hand, when myotoxin II was incubated with MAb-4 at a ratio of 1:1 there were 15-20% of necrotic fibers in the various histological sections examined.

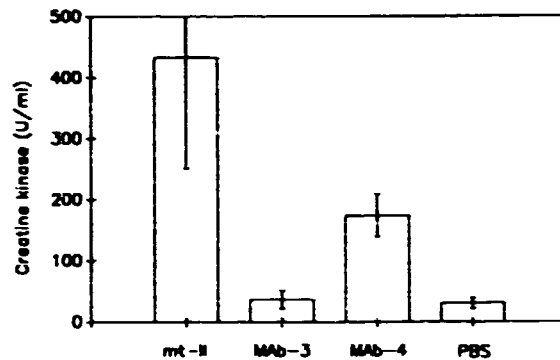


FIG. 2. NEUTRALIZATION OF MYOTOXIC ACTIVITY OF MYOTOXIN II BY MONOCLONAL ANTIBODIES. Mixtures of *B. asper* myotoxin II (mt-II) and monoclonal antibodies MAb-3 and MAb-4 were injected *i.m.* into groups of four mice for the evaluation of myotoxic activity. Mice were bled at 3 hr and creatine kinase activity of plasma was determined. Results are shown as mean \pm S.D. ($n = 4$). The monoclonal antibody: myotoxin molar ratios for MAb-3 and MAb-4 were 1:1 and 1.5:1, respectively. PBS: phosphate-buffered saline. A significant ($P < 0.05$) reduction of creatine kinase values was observed with both monoclonal antibodies; however, when using MAb-4, creatine kinase values were significantly ($P > 0.05$) higher than those of the PBS control group.

Neutralization of myotoxicity of crude *B. asper* venom

Both monoclonal antibodies MAb-3 and MAb-4 were able to neutralize the myotoxic activity of crude venom in mice (Fig. 4). Creatine kinase values obtained with the highest proportions of antibodies tested were comparable to those of control mice injected with phosphate-buffered saline. In repeated experiments, using different batches of monoclonal antibodies, myotoxic activity of the venom was reduced by 80–100%.

Neutralization of PLA₂ activity of myotoxin I

Figure 1 shows that the enzymatic activity of myotoxin I was not neutralized after incubation with monoclonal antibodies MAb-3 or MAb-4, while simultaneous testing of

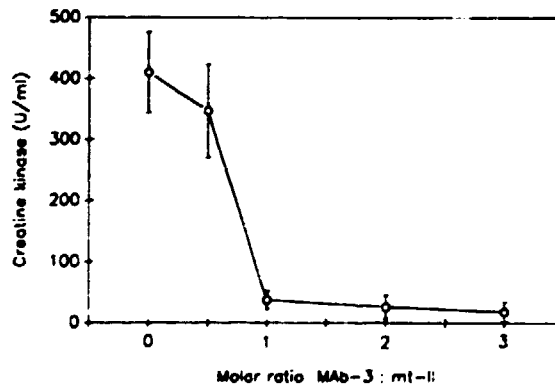


FIG. 3. NEUTRALIZATION OF MYOTOXIN II BY MONOCLONAL ANTIBODY MAb-3. *Bothrops asper* myotoxin II (mt-II) was mixed with monoclonal antibody MAb-3 at different molar ratios. The mixtures were injected *i.m.* into groups of four mice and plasma creatine kinase activity was determined (see legend of Fig. 2). Results are shown as mean \pm S.D. ($n = 4$).

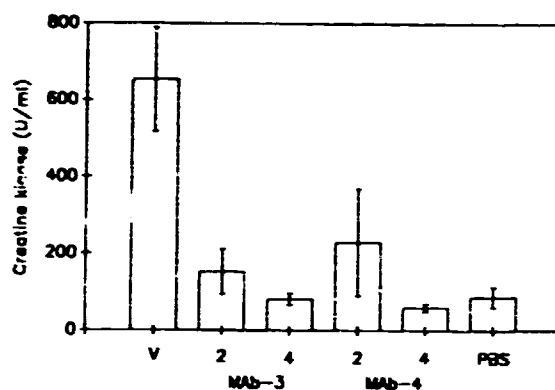


FIG. 4. NEUTRALIZATION OF MYOTOXIC ACTIVITY OF CRUDE *B. asper* VENOM BY MONOCLONAL ANTIBODIES.

Mixtures of crude *B. asper* venom and monoclonal antibodies MAb-3 and MAb-4 were injected *im* into groups of four mice for the evaluation of myotoxic activity. Results are shown as mean \pm S.D. The monoclonal antibody:venom ratios tested were 2 and 4 ml ascites preparation mg venom (shown as 2 and 4 on abscissa) which corresponded to 15.2 and 30.4 mg antibody mg venom for MAb-3, and 7.0 and 14.0 mg antibody mg venom for MAb-4. V: venom; PBS: phosphate-buffered saline. All groups showed a significant ($P < 0.05$) reduction of creatine kinase values in comparison to venom alone. Values of groups MAb-3 (2) and (4), and MAb-4 (4) were not significantly different from those corresponding to PBS.

the mixtures for myotoxic activity indicated complete neutralization. Increasing amounts of monoclonal antibodies did not improve neutralization of enzymatic activity. As a control, the polyvalent antivenom neutralized completely the PLA₂ activity of myotoxin I, at antivenom:toxin ratios of 1 ml/mg and 4 ml/mg.

DISCUSSION

The neutralization of two myotoxic PLA₂s from the venom of *B. asper*, myotoxins I and II, by two murine monoclonal antibodies, is reported. The neutralizing IgG1 monoclonal antibodies studied, MAb-3 and MAb-4, recognize different epitopes on the myotoxins, as demonstrated by differential reactivity patterns against toxin isoforms, and competition binding assays (LOMONTE and KAHAN, 1988). MAb-3 completely neutralized myotoxic activity of both myotoxins I and II, whereas MAb-4 neutralized completely myotoxin I, but only partially neutralized myotoxin II, when tested at the same molar ratio. These results are in agreement with the reactivity patterns previously reported for MAb-3 and MAb-4 against the different myotoxin isoforms, since MAb-3 binds strongly to at least four venom isoforms by ELISA and immunoblotting analyses (LOMONTE and KAHAN, 1988), and is probably directed against a relatively conserved epitope of several bothropic myotoxins (LOMONTE *et al.*, 1990a, c). On the other hand, MAb-4 does not bind to myotoxin II when this protein is immobilized on solid phases such as plastic microplates or nitrocellulose membranes (LOMONTE and KAHAN, 1988). Similarly, myotoxin II does not precipitate with MAb-4 by gel immunodiffusion, and does not bind to a column of MAb-4 immobilized on CNBr-activated Sepharose (LOMONTE and GUTIERREZ, 1989). Present results suggest that MAb-4 may have at least a weak affinity for free myotoxin II during incubation at 37°C, since a partial reduction of myotoxic activity was observed.

The neutralizing ability of MAb-3 against purified myotoxin II was tested in more detail, in order to compare it with previous results obtained with affinity-purified polyclonal antibodies from commercial equine antivenom. MAb-3 completely neutralized myotoxicity at a molar ratio of 1:1, whereas polyclonal antibodies required a 2:1 ratio to achieve the same effect (LOMONTE *et al.*, 1990b). This higher neutralizing ability should be expected, considering that polyclonal antibodies would recognize several epitopes on the toxin, some of which would probably not be involved in neutralization, whereas neutralizing monoclonal antibodies recognize only one site, which would result in an inhibition of myotoxic activity. The fact that myotoxic phospholipases can form dimers, and therefore, precipitable complexes with single monoclonal antibodies such as MAb-3 and MAb-4 (LOMONTE and KAHAN, 1988; LOMONTE and GUTIÉRREZ, 1989), may be relevant for studying the mechanism of neutralization. It is not known whether these two antibodies bind to the active site for myotoxicity, or alternatively, whether they interfere with this biological activity by other mechanisms, such as by forming linear or cyclical immune complexes *in vitro*, in which the toxin is unable to interact with its target *in vivo*. Future studies should be performed with monovalent (Fab) fragments of the antibodies.

A dissociation of myotoxic and PLA₂ activities of myotoxin I was evidenced with both monoclonal antibodies. Myotoxin I retained enzymatic activity while its myotoxic activity was completely abolished, at the same antibody:toxin ratio. This observation suggests that the molecular regions responsible for the two activities might be different (LOMONTE and GUTIÉRREZ, 1990). Interestingly, the dissociation observed with monoclonal antibodies was the reverse of that reported when using polyclonal antibodies, since with the latter, enzymatic activity was neutralized much more easily than myotoxicity (LOMONTE *et al.*, 1987; Fig. 1, present results). Other authors have reported clear dissociations of different activities of PLA₂s by neutralization experiments with polyclonal antibodies (KASTURI and GOWDA, 1990), monoclonal antibodies (STRONG *et al.*, 1984; DANSE and KEMPE, 1989; MOLLIER *et al.*, 1990) or by specific chemical modifications (ROSENBERG *et al.*, 1989; TAKASAKI *et al.*, 1990).

Both monoclonal antibodies neutralized the myotoxic action of crude *B. asper* venom when pre-incubated *in vitro*. This observation confirms the concept, already supported by experiments with polyclonal antibodies (LOMONTE *et al.*, 1985, 1987, 1990b), that venom-induced myonecrosis is mainly mediated by this group of basic phospholipase isoforms. The fact that a single monoclonal antibody can neutralize a clinically relevant effect of a crude snake venom is encouraging for future therapeutic strategies based on hybridoma technology (TRÉMEAU *et al.*, 1986). The neutralizing ability of these antibodies by *in vivo* experiments in which they are administered after envenomation remains to be studied.

Acknowledgements. We thank Drs LAWRENCE KAHAN, EDUARDO MORENO, ELENA CARMONA, MARIA ELENA ROVIRA, and LEONEL CALDERON for valuable help. The financial support from International Foundation for Science (grant F-1388-2) and Vicerrectoria de Investigación, Universidad de Costa Rica (No. 741-88-009) is acknowledged. B. LOMONTE and J. M. GUTIÉRREZ were recipients of research career awards from the Costa Rican National Scientific and Technological Research Council (CONICIT) during this study.

REFERENCES

- DANSE, J. M. and KEMPE, J. (1989) Preparation and characterization of monoclonal antibodies against β -bungarotoxin and its A- and B-chains. *Toxicon* 27, 1011-1019.
- DOLL, V. P. (1956) A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.* 35, 150-154.

FRAN
(T)
GUT
ver
GUT
pa
GUT
to
KAB
KAB
a r
KAN
th
LAV
V.
LOM
su
LOM
U.
LOM
B.
LOM
m
LOM
th
LOM
U.
m
LOM
m
LOM
R.
I
LOM
at
MIG
as
MIS
MIG
sr
MOI
pr
E.
MOI
gr
ROV
di
I
STR
B.
pl
LAK
cl
U
TRY
a
TRI
E.
2

- FRANCIS, B., GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. and KAISER, I. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Archs Biochem. Biophys.* **284**, 352-359.
- GUTIÉRREZ, J. M., ARROYO, O. and BOLAÑOS, R. (1980) Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* **18**, 603-610.
- GUTIÉRREZ, J. M., OWENBY, C. L. and ODELL, G. V. (1984) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* **22**, 115-128.
- GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B., CHAVES, F., MORINO, E. and CERDAS, L. (1986) Pharmacological activities of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol.* **94C**, 159-164.
- KABAT, E. A. and MAYER, M. (1961) *Experimental Immunochimistry*. Springfield, Charles C. Thomas.
- KAISER, I. E., GUTIÉRREZ, J. M., PLUMMER, D., AIRD, S. D. and ODELL, G. V. (1990) The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Archs Biochem. Biophys.* **278**, 319-325.
- KASTURI, S. and GOWDA, T. V. (1990) Detection, using antibodies, of pharmacologically active sites, apart from the catalytic site, on venom phospholipase A₂. *Toxicon* **28**, 91-99.
- LAMMILI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LOMONTE, B. and GUTIÉRREZ, J. M. (1989) A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* **27**, 725-733.
- LOMONTE, B. and GUTIÉRREZ, J. M. (1990) Dissociation of enzymatic and toxic activities by the use of antibodies (Letter to the Editor). *Toxicon* **28**, 1245-1246.
- LOMONTE, B. and KAHAN, L. (1988) Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. *Toxicon* **26**, 675-689.
- LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M. and MATA, E. (1985) Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* **23**, 807-813.
- LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., MORINO, E. and CERDAS, L. (1987) Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* **25**, 443-449.
- LOMONTE, B., FURTADO, M. F., ROVIRA, M. E., CARMONA, F., ROJAS, G., AYMERICH, R. and GUTIÉRREZ, J. M. (1990a) South American snake venom proteins antigenically-related to *Bothrops asper* myotoxins. *Braz. J. med. biol. Res.* **23**, 427-435.
- LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., CARMONA, E. and ROVIRA, M. E. (1990b) Equine antibodies to *Bothrops asper* myotoxin II: isolation from polyvalent antivenom and neutralizing ability. *Toxicon* **28**, 379-384.
- LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., FURTADO, M. F., OTERO, R., ROSSO, J. P., VARGAS, O., CARMONA, E. and ROVIRA, M. E. (1990c) Isolation of basic myotoxins from *Bothrops muniti* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* **28**, 1137-1146.
- LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M., ROJAS, G. and CALDERÓN, L. (1991) Quantitation by enzyme-immunoassay of antibodies against *Bothrops* myotoxins in four commercially-available antivenoms. *Toxicon* **29**, 695-702.
- MERS, D. and OWENBY, C. L. (1990) Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol. Ther.* **48**, 223-236.
- MISEZ, A. (1985) Molecular immunology of snake toxins. *Pharmacol. Ther.* **30**, 91-113.
- MIDDLEBROOK, J. I. and KAISER, I. I. (1989) Immunological relationships of phospholipase A₂ neurotoxins from snake venoms. *Toxicon* **27**, 965-977.
- MOLLER, P., CHWETZOFF, S., FRACHON, P. and MISEZ, A. (1989) Immunological properties of notexin, a potent presynaptic and myotoxic component from venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *FEBS Lett.* **250**, 479-482.
- MOLLER, P., CHWETZOFF, S. and MISEZ, A. (1990) A monoclonal antibody recognizing a conserved epitope in a group of phospholipases A₂. *Molec. Immun.* **27**, 7-15.
- ROSENBERG, P., GHASSEMI, A., CONDREA, E., DHILLON, D. and YANG, C. C. (1989) Do chemical modifications dissociate between the enzymatic and pharmacological activities of β -bungarotoxin and notexin? *Toxicon* **27**, 137-159.
- STRONG, P. N., WOOD, J. N. and IVASYI, J. (1984) Characterization of monoclonal antibodies against β -bungarotoxin and their use as structural probes for related phospholipase A₂ enzymes and presynaptic phospholipase neurotoxins. *Eur. J. Biochem.* **142**, 145-151.
- TAKASAKI, C., SUGAMA, A., YANAGITA, A., TAMIYA, N., ROWAN, E. G. and HARVEY, A. L. (1990) Effects of chemical modifications of PA-11, a phospholipase A₂ from the venom of Australian king brown snake (*Pseustes australis*), on its biological activities. *Toxicon* **28**, 107-117.
- TRAUER, P., MIZUSHIMA, S., LOWRY, C. V. and NOMURA, M. (1971) Reconstitution of ribosomes from subribosomal components. *Meth. Enzymol.* **20**, 391-417.
- TREMEAU, O., BOUJAIN, J. C., COUDERC, J., FROMAGNOT, P. and MISEZ, A. (1986) A monoclonal antibody which recognized the functional site of snake neurotoxins and which neutralizes all short-chain variants. *FEBS Lett.* **208**, 236-240.

IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *MICRURUS NIGROCINCTUS*
NIGROCINCTUS VENOM WITH MONOCLONAL AND POLYCLONAL
ANTIBODIES

Alberto Alape-Girón * 1,2, Björn Gustafsson 3,4, Bruno Lomonte 1 and
Monica Thelestam 4.

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

2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de
Costa Rica, San José, Costa Rica.

3 Department of Vaccine Production, National Bacteriological Laboratory,
Stockholm, Sweden

4 Department of Bacteriology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

* Corresponding author

ABSTRACT

Murine monoclonal antibodies directed against *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* whole venom were produced. The specificity of the antibodies was ascertained by enzyme-linked immunosorbent assay.

Isoelectric focusing of the venom revealed a total of 17 bands: 16 with isoelectric points in the range from 4.5 to 8.1 and one prominent band with an isoelectric point higher than 9.3. *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom components were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under various conditions. The venom components separated into seven bands under native conditions, whereas 11 bands were obtained following urea-PAGE. Under non-reducing conditions in SDS-PAGE four sharp and three diffuse bands were observed. The diffuse bands have molecular weights ranging from 14.5 K to 32 K whereas the sharp bands have molecular weights of 72, 50, 12 and 10 K. The sharp bands remain under reducing conditions and furthermore a prominent band of 14 K is also observed. The overall results suggest the presence of isoforms with molecular weights of 14K or lower.

Two antibodies (MAb 21 and MAb 4) recognized all the diffuse bands whereas three antibodies (Mabs 7G, 22 and 26) reacted with the 72 K protein in immunoblots of venom components from non-reducing SDS-PAGE. MAbs 21 and 28 both reacted with the 14 K band whereas MAb 7G recognized the 72 K band obtained from reducing SDS-PAGE. One antibody (MAb 27) partially neutralized the phospholipase A₂ activity of the venom. A pool of 3 MAbs (MAb 4, MAb 7G and MAb 21), in preincubation experiments, exerted partial protection from the lethal effect of the venom as tested in a mouse challenge assay.

COMPARATIVE STUDY OF VENOMS FROM *MICRURUS* SNAKES: INDIVIDUAL
ELECTROPHORETIC VARIABILITY IN *MICRURUS NIGROCINCTUS*
NIGROCINCTUS AND IMMUNOCHEMICAL VARIABILITY AMONG DIFFERENT
MICRURUS TAXA.

Alberto Alape-Girón * 1,2, Bruno Lomonte ¹ Björn Gustafsson ^{3,4}, and
Monica Thelestam ⁴

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

2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de
Costa Rica, San José, Costa Rica.

3 Department of Vaccine Production, National Bacteriological Laboratory,
Stockholm, Sweden.

4 Department of Bacteriology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

* Corresponding author

ABSTRACT

The electrophoretic mobilities of venom components from different *Micrurus* species were studied in polyacrylamide gels. The venoms showed species specific patterns under native conditions (PAGE) as well as under denaturing conditions on urea-PAGE. However, the patterns obtained in SDS-PAGE were similar to each other. A variable number of proteins with molecular weights above 45 K were observed in all venoms studied. Diffuse bands in the range of 14 to 35 K were also observed in several venoms under non-reducing conditions. Under reducing conditions bands with molecular weights of 14 K or lower were prominent.

PAGE of twenty two individual *M. nigrocinctus nigrocinctus* venom samples showed some completely conserved components, whereas other proteins exhibited intraspecies variations.

Based on the reactivity of the venoms with a panel of eleven monoclonal antibodies raised against *M. n. nigrocinctus* venom, it was possible to include the venoms from *M. n. nigrocinctus*, *M. nigrocinctus mosquitensis*, *M. fulvius fulvius*, *M. dumerilii carnicauda* and *M. albicinctus* into one group, whereas *M. frontalis frontalis* and *M. frontalis braziliensis* venoms constitute a second group. *M. alleni* and *M. spixii spixii* showed reactivity patterns similar to groups 1 and 2, respectively. The venom from *M. surinamensis surinamensis* reacted with only one of the monoclonal antibodies. Venoms from *M. corallinus*, *M. ibibiboca*, *M. hemiprichii ortonii*, *M. lemniscatus helleri* and *M. mipartitus* reacted with the panel of monoclonal antibodies showing individual patterns.

MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMMUNOAFFINITY ISOLATION AND
NEUTRALIZATION OF MYOTOXIC PHOSPHOLIPASES FROM *MICRURUS*
NIGROCINCTUS NIGROCINCTUS VENOM.

Alberto Alape-Girón * 1,2, Björn Gustafsson 3,4, Bruno Lomonte 1 and
Monica Thelestam 4.

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

2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Costa
Rica, San José, Costa Rica.

3 Department of Vaccine Production, National Bacteriological Laboratory,
Stockholm, Sweden

4 Department of Bacteriology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

* Corresponding author

ABSTRACT

A murine monoclonal antibody (MAb 9A) was used to isolate by immunoaffinity chromatography a myotoxic and phospholipolytic preparation from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom. The preparation, called Nigroxin, appeared as a single 14.5 K band upon SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions. On urea-PAGE three bands were resolved, representing isoforms called Nigroxin a, b and c, which probably have similar isoelectric points.

Nigroxin has phospholipase activity since it induced lysis of sheep erythrocytes in an indirect hemolytic assay, as well as the release of fatty acids from alpha-phosphatidylcholine. The phospholipase activity of Nigroxin was completely inhibited by another monoclonal antibody (MAb 27) prepared against *M. nigrocinctus nigrocinctus* venom. Nigroxin also induced a dose-dependent release of peroxidase trapped in negatively charged liposomes. Furthermore, Nigroxin is myotoxic, since it increased the plasma creatine kinase levels in mice when injected intramuscularly, and induced necrosis of the muscle tissue. The plasma membranes of cultured L6 myoblasts were permeabilised after treatment with Nigroxin, as measured by the release of ³H-uridine nucleotides from prelabelled cells. This effect was completely abolished after preincubation of Nigroxin with MAb 9A, which does not affect the enzymatic activity.

Studies of the reactivity in ELISA of MAbs 9A and 27 against several snake venoms and toxins showed that MAb 9A could recognize venoms from another *M. nigrocinctus* subspecies and three other *Micrurus* species. MAb 27 reacted with the same venoms as MAb 9A, and in addition with the venoms from seven other *Micrurus* species. Neither MAb recognized venoms from *Bothrops asper*, *Notechis scutatus*, *Pseudechis australis* or *Laticauda semifasciata*. Nor did they react with purified pancreatic phospholipase A₂ or Notexin, a myotoxic and neurotoxic snake venom phospholipase A₂. Interestingly, however, both MAbs recognized crude venom from *Naja nigricollis* as well as beta-bungarotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ which lacks myotoxicity. These results suggest that Nigroxin has greater antigenic similarity to the subgroup of phospholipases from Asian/African Elapids than to the enzymes of the marine/Australian subgroup.