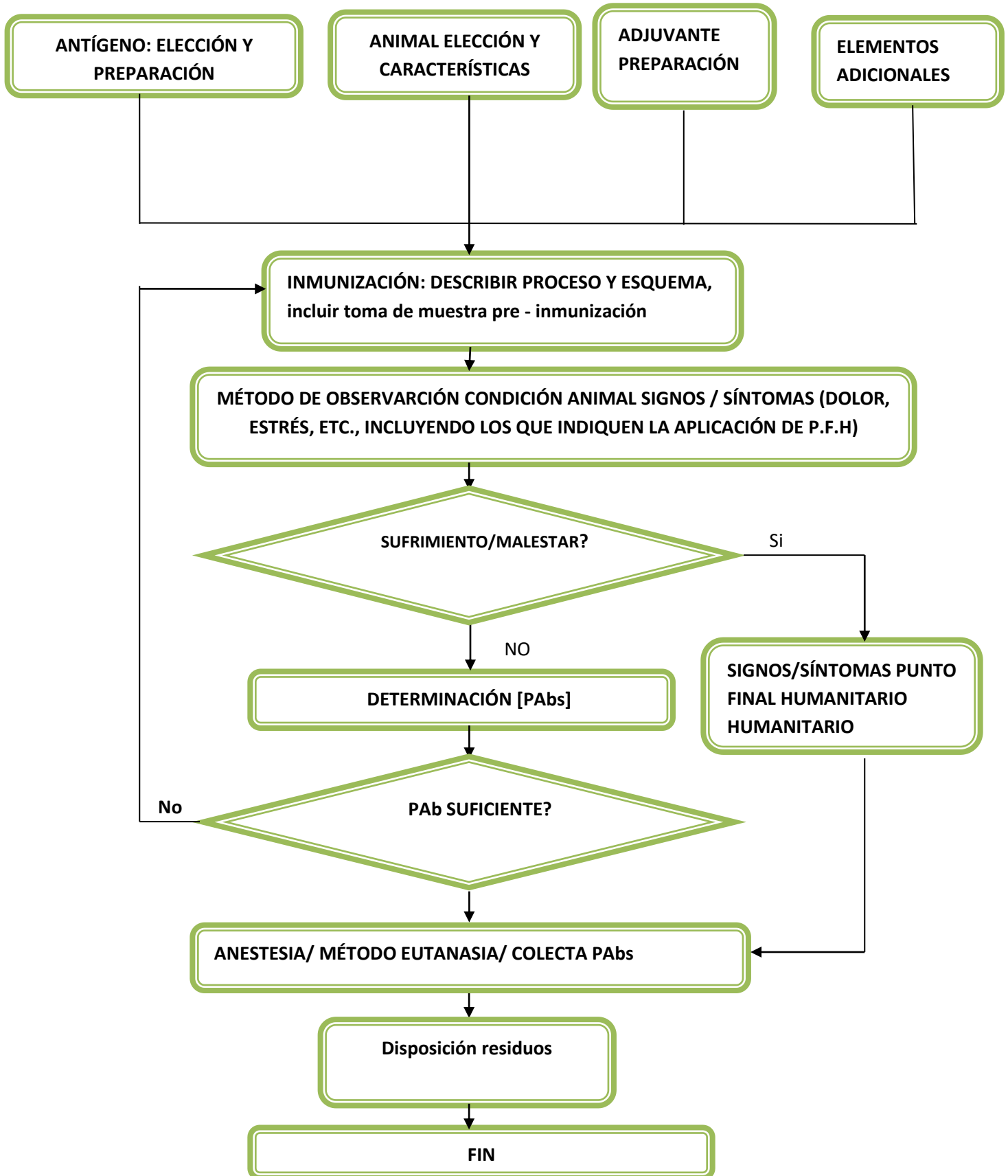


**PROCEDIMIENTO ESTANDAR PARA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS
POLICLONALES (pAbs) Y MONOCLONALES (mAbs)**



PRESENTACIÓN:

Estos procedimientos son una guía elaborada y revisada por el COMITÉ DE BIOÉTICA del Instituto de Biotecnología, sometidos a revisión de los líderes académicos, se agradece la revisión y comentarios de la Q.F.B. Rafaela Espinosa Organista.

CUADRO 1. PROCEDIMIENTO ESTANDAR PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

COMITÉ DE BIOÉTICA DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA NOVIEMBRE, 2019

No se permite la administración de sustancias en el cojinete planar, ni en ganglios. La ruta IP no es recomendada para producción de anticuerpos policlonales, por probables efectos de peritonitis, o cambios de comportamiento.

ES FUNDAMENTAL MINIMIZAR MOLESTIAS A LOS ANIMALES por lo que se recomienda que el personal de la Unidad de Bioterio, pueda indicar si se requiere aplicar analgésicos o anestésicos.

ACCIÓN	OBSERVACIONES
PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO (Ag)	Indicar procedencia y método de preparación de los antígenos para lograr la mayor pureza. Observar que haya un control del pH a nivel fisiológico. Mantener condiciones de esterilidad durante la preparación de la mezcla de antígeno e indicar la cantidad a usar. Si el antígeno es una toxina o cualquier otra sustancia tóxica para el animal, se debe justificar su uso, indicando cuáles serían los síntomas patológicos que pudieran presentarse durante el proceso de inmunización y cuáles los parámetros para la determinación del punto final humanitario (PFH).
ELECCIÓN Y MANEJO DEL ANIMAL	Indicar: número animales, especie, edad. Garantizar, además la capacitación y experiencia del personal del proyecto encargado de esta parte (NO del personal de la U. DE BIOTERIO), en la manipulación de animales de laboratorio, inoculación, toma de muestras, observación y valoración del estado de salud del animal, para evitar estrés, dolor. etc. En casos graves, identificar las condiciones que ameriten aplicar el punto final humanitario. Indicar con el detalle necesario, el lugar y condiciones en los que se mantendrán a los animales. Los más usados en U.B. del IBt ejem: Ratón – cuando se requiere poco pAb; rata – ANTIRATÓN o IgE; más usado conejo (hasta 250mg de pAb). También se han usado gallinas (250mg/huevo, antimamíferos), caballos, borregos, etc.,
ELECCIÓN DEL ADYUVANTE	Usar adyuvante INCOMPLETO de Freund y/o sales de aluminio (ver recomendaciones y esquema inmunización), si usa otros adyuvantes: Justificar y ver http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?alerno:0,clase:betica,tit:Recommendatioclase:betica,tit:Recommendations for Use and Alternatives to Freund's Complete Adjuvant,tipo:doc,edi:d,dir:bioe_alternativas_friends.html,pre:betica .
ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN	Describir ruta, periodicidad y volumen de administración de sustancias, Núm. sitios, volumen, fecha suministro, peso del animal, etc. (ver CCA, 1992 APENDIX b) (ejemplo Cuadro 2).

ACCIÓN	OBSERVACIONES
OBSERVACIÓN Y CUIDADO DE LOS ANIMALES	Resumir y determinar método de observación de estado del animal, medidas para disminuir malestar y/o enfermedad y signos/síntomas que determinarán finalizar experimento PFH. Observación diaria si hay respuesta Inflamatoria, vigilar consumo de agua y alimento, etc.
SEDACIÓN	Indicar uso de sedantes, analgésicos, anestésicos ver Reglamento del Comité de Bioética http://ibt.unam.mx/computo/pdfs/ReglamentoComiteBioeteicaAprobadoCI.pdf
EUTANASIA	Describir método a utilizar.
RESIDUOS	Indicar la forma en que serán almacenados/dispuestos los distintos productos/residuos

En caso del uso de sustancias tóxicas o patógenos (Grupo de Bioseguridad 2 o mayor), indicar medidas de bioseguridad / seguridad y anexar Manual de bioseguridad, con firma de capacitación de los participantes.

Es importante que la mezcla adyuvante/inmunógeno se pueda inyectar fácilmente y en volúmenes lo más bajos posible, para evitar sufrimiento de animales. Si fuera posible y/o necesario, se sugiere usar emulsificantes.

Está permitido que para inmunógenos que sean moléculas pequeñas se utilice en la primera aplicación ACF vía SC (no ID ni IM) bajo condiciones asépticas y evitando derrames, así como indicar proceso y cuidado del animal.

Solo se puede usar el mismo sitio de la primera inmunización o uno cercano, siempre y cuando NO haya reacción inflamatoria.

CUADRO 2. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

La colección de suero pre-inmune debe ser de máximo el 10% del volumen de sangre del animal (Leenaars, et al, 2005). Dependiendo del peso del animal, sería aproximadamente para conejos 15 ml, rata 2 ml y en el caso del ratón 0.3 ml.

La 1ª Inoculación con Adyuvante Incompleto de Freund o sales de aluminio (fosfato o hidróxido de aluminio ver Gupta y Rost, 2000). Una relación 1/1, V/V de antígeno/adyuvante, subcutánea (SC). En el CCAC, 2002, se pueden consultar los volúmenes máximos que se pueden inyectar.

En la a 2ª. Inoculación es posible aplicar soluciones de antígeno-sales de aluminio (como adyuvante).

El esquema de inmunización, debe señalar cuando menos la información sobre: el agente usado, la ruta de inyección, núm. de sitios y volumen, fecha de inyección, como se muestra a continuación

CUADRO 2. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN /TOMA DE MUESTRA (CONEJO)

NÚM. ADMINISTRACIÓN	(DÍA)	PROCEDIMIENTO	Unidades ANTÍGENO-, Unidades de Adyuvante unidades/V solvente)	Ruta, Vol. Admon. (#sitios) Ver Apéndice B, CCAC,2002	PESO ANIMAL (Unidad) (Inicial y cuando sea necesario)	OBSERVACIONES
0	DIA 1	Colección suero pre-inmune (máximo entre el 7.5% y 10% del volumen total de sangre del animal (1% del peso, Leenaars, et al, 2005).	--			
1		Primera inoculación		SC, X ml, (# sitios)		
2	Entre sem. 2 a 4	Segunda inoculación		SC, X ml, (# sitios)		
N	Sem 4 a 6	Tercera inoculación		SC, X ml, (# sitios)		
	Toma de muestra para ver concentración de pAbs					
	Anestesia y eutanasia					

Las rutas de inyección, vols. máximos, etc. se pueden consultar en Apéndices de CCA, 2002.

BIBLIOGRAFÍA

Fecha consulta 20 septiembre 2019

(CCAC) Canadian Council on Animal Care. Guidelines: on antibody production. 2002.

https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf

Marginal ear vein/artery, Technique, <https://www.nc3rs.org.uk/rabbit-marginal-ear-veinartery-non-surgical>

Gupta, R. and B. E. Rost. 2000. Aluminum Compounds as Vaccine Adjuvants, Methods in molecular medicine,

https://www.researchgate.net/publication/264496939_Aluminum_Compounds_as_Vaccine_Adjuvants

Leenaars, Marlies, Coenraad F. M. Hendriksen. 2005. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations, ILAR Journal, 46, 3,

<https://academic.oup.com/ilarjournal/article/46/3/269/739081>

Parasuraman, S., R. Raveendran y R. Kesavan. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, 1(2): 87 <http://www.jpharmacol.com/article.asp?issn=0976-500X;year=2010;volume=1;issue=2;spage=87;epage=93;aulast=Parasuraman>

Turner, P.V., T. Brabb, C. Pekow and M.A. Vasbinder. 2011. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 50: 600-613.

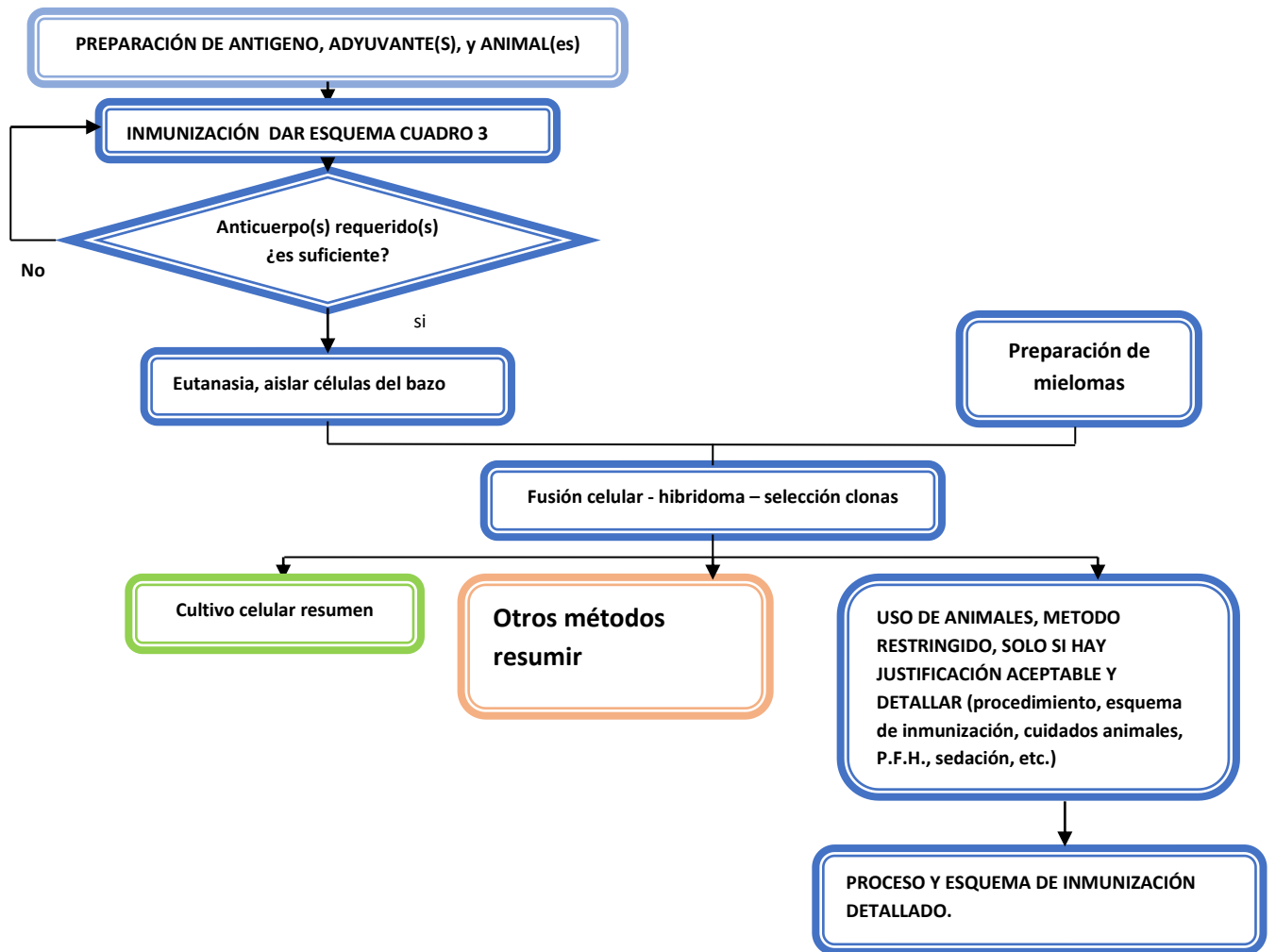
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189662/>

Harlow, Ed and David Lane, 1988, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (Capt. 5 y 6)

Raabe, Brigitte M., James E. Artwohl, Jeanette E. Purcell, Jamie Lovaglio, and Jeffrey D. Fortman, 2011, Effects of Weekly Blood Collection in C57BL/6 Mice, J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., 50(5): 680–685.

PROCEDIMIENTO ESTANDAR PARA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

MONOCLONALES (mAbs)



INDICACIONES GENERALES

Verificar y justificar **CON EVIDENCIA** SI ES QUE **NO** se pueden obtener los mAbs comercialmente. Para la evaluación del procedimiento por parte del Comité de Bioética del IBt/UNAM, se debe presentar INFORMACIÓN DETALLADA DE PROCEDIMIENTO (Incluyendo medidas para reducir dolor - incomodidad de animales, condiciones de mantenimiento, observación, esquema de inoculación (Cuadro 3 -primera parte del proceso- y, en su caso el Cuadro 4).

Etapas para la producción:

- 1) **PRIMERA ETAPA.** Inducción de la producción de anticuerpos en las células linfáticas *in vivo* por inmunización, y la selección de hibridomas *in vitro*.

CUADRO 3. PROCEDIMIENTO ESTANDAR PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (mAb) PRIMERA ETAPA

Ejemplo de un esquema de inmunización para 1 ratón BALB/c, normalmente se usan 6 ratones hembra.

NÚM. ADMINIS TRACIÓN	(DÍA)	PROCEDIMIENTO	Unidades ANTÍGENO-, Unidades de Adyuvante unidades/V solvente)	Ruta, vol. Admon. (#sitios)	PESO ANIMAL (Unidad) cuando sea requerido	OBSERVACIONES
	DIA 1	Colección SUERO pre-inmune (máximo 10% del Vol. de sangre total, o aprox. 1% del peso)	--	VENA CAUDAL		
1		Primera inmunización. Mantener condiciones de esterilidad durante la preparación de la mezcla de antígeno, e indicar la cantidad a usar	250µl de sol. (ADYUVANTE INDICAR) sol. buffer + 250µl sol. Antígeno (indicar concentración) Ó UNIDAD antígeno + U.	IP, 500 µl (1 sitio)		
2	Día 15	Segunda inmunización	250µl de sol. ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND (AIF) +250µl sol. antígeno	500 µl (1 sitio)		
	Día 24	Toma de muestra		V. CAUDAL		DILUIR 1:5 buffer de fosfatos (PBS) Y COMPRARAR SUERO DÍA 1
3	Día 35	Tercera inmunización	AIF	IP		
	Día 45	Toma de muestra		V. CAUDAL		
4	Día 56	inmunización		IV 100 µl E IP 100 µl (USAR AIF)		

NÚM. ADMINIS TRACIÓN	(DÍA)	PROCEDIMIENTO	Unidades ANTÍGENO-, Unidades de Adyuvante unidades/V solvente)	Ruta, vol. Admon. (#sitios)	PESO ANIMAL (Unidad) cuando sea requerido	OBSERVACIONES
	Día 59	Anestesia y Eutanasia				
	DIA N	Fusión de esplenocitos				

FUENTE: Harlow, Ed and David Lane, 1988: 151.

2) **SEGUNDA ETAPA:** Propagación de hibridomas:

2.1) *in vitro*: en cultivo de hibridomas en caldo de cultivo, describir brevemente el procedimiento.

2.2) Otros métodos como las técnicas de expresión de proteínas recombinantes, que pueden ser producidas en animales modificados genéticamente (debe hacerse también con base en lineamientos internacionales), o tecnología de bibliotecas de fagos (phage display techniques).

2.3) *in vivo*, **MÉTODO RESTRINGIDO**, porque se produce dolor y estrés a los animales, se revisará detalladamente y sólo se podrá aprobar si su uso está ampliamente justificado y respaldado con evidencias y con descripción del proceso detallado (condiciones para manejo de los animales, esquema de inmunización, determinación de punto final humanitario, etc.). **Los procesos deben ser desarrollados por personal muy capacitado y experto en el proceso, debe haber observación diaria de los animales, por personal capaz de reconocer los signos de estrés, y los del PFH, limitar, en lo posible, el número de toma de muestras (3 o 4), etc.**

No se permite la administración de sustancias en el cojinete planar, ni en ganglios. La ruta IP no recomendada por probables efectos de peritonitis y cambios de comportamiento, por lo que debe hacerse el menor número de veces y por personal experto.

ES FUNDAMENTAL MINIMIZAR MOLESTIAS A LOS ANIMALES, por lo que se recomienda que el personal de la Unidad de Bioterio, pueda indicar si se requiere aplicar analgésicos o anestésicos.

Bibliografía:

Guidelines for Ascites Production in Mice, 2014,

https://www.med.hku.hk/images/document/04research/culatr/NIH_Guidelinese_for_Ascitis_Production_in_Mice_2016.pdf

Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee. **Monoclonal antibody production**,

(CMPMA/ILAR/NRC) Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies, Institute for Laboratory Animals Research National Research Council, **Monoclonal Antibody Production**. National Academy Press, 1999.

<http://grants.nih.gov/grants/policy/antibodies.pdf>

Greenfield, Edward (ed), 2014, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, https://www.cshlpress.com/default.tpl?cart=156950859358932057&fromlink=T&linkaction=full&linksortby=oop_title&--eqSKUdatarq=975, <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/Antibodies2/AB2Intro7Part1.pdf>

Harlow, Ed and David Lane, 1988, *Antibodies a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (Lab. Arias/López).