

(19) REPUBLICA DE CUBA



Oficina Cubana de la  
Propiedad Industrial

(11) No de publicación:

**CU 22626 A1**

(21) No. de solicitud : **1996/050**

(51) Int. Cl: **G01N 33/577**

(12)

## Certificado de Autor de Invención

---

(22) Fecha de presentación: 1996.05.30

(71) Solicitantes: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
DE CÍTRICOS Y FRUTALES; (CU)

(30) Prioridad:

(72) Inventor/es: Díaz Miranda, Nelson (SU) ; Porras  
Castellanos, Delia Nancy (CU) ; Rodríguez, Irenio (CU) ;  
Gutiérrez Varela, Adirén (CU) ; Zayas Acosta, Mirta (CU) ;  
Higginson Clarke, David ; (CU)

(45) Fecha de publicación: 2000.12.22

(73) Titular: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
DE CÍTRICOS Y FRUTALES ,domiciliado en Ave. 23 no.  
22816 e/222 y 234, Playa, C. Habana; (CU)

(74) Agente: Acosta Porta, Zita María ; (CU)

---

(54) Título: **ANTICUERPO MONOCLONAL PARA EL DIAGNOSTICO DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CITRICOS.**

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con la rama de la Biotecnología y en particular con la obtención de un anticuerpo monoclonal para el diagnóstico del virus de la tristeza de los cítricos (CTV). Consiste en un anticuerpo monoclonal (AcM) específico para la detección del virus, que se caracteriza por ser de subclase IgG2a y reconocer el 95% de los aislados del CTV frente a los que se ha probado. Además, reconoce un epítopo (region de la proteína de cubierta del virus) que no habia sido detectado previamente. El AcM obtenido puede ser utilizado en el diagnóstico y en la caracterización del aislados del CTV.

## **MEMORIA DESCRIPTIVA**

1996/050

### **ANTICUERPO MONOCLONAL PARA EL DIAGNOSTICO DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CITRICOS**

**La presente invención se relaciona con la rama de la biotecnología y en particular con un procedimiento para la obtención de un anticuerpo monoclonal (AcM), que puede ser utilizado para el diagnóstico del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y además para la caracterización de aislados de dicho virus.**

**La fusión de células de mieloma de ratón y células de bazo procedentes de ratones inmunizados fue realizada por Kohleer y Milstein en 1975 (Nature 256:495-497). Con esta experiencia, se puso de manifiesto por primera vez que era posible obtener una línea celular, que produjera un anticuerpo homogéneo, el cual fue denominado anticuerpo monoclonal.**

**Varios investigadores han trabajado en la obtención de ACMs el CTV. Vela y col. En 1986 informaron la obtención de AcMs específicos contra el CTV, así como su posible utilización para pesquisajes masivos del virus, debido a que estos AcMs reconocían aislados del virus muy diferentes entre sí, en cuanto a intensidad de los síntomas (Número de patente 536923, País España, Cl.: G01N 33/577. Un procedimiento para producir anticuerpos monoclonales específicos contra el CTV).**

**Por su parte Gumpf y col. Informaron en 1987 la producción de un AcM que reconocía diferentes aislados del virus. Su reacción era extremadamente baja, tanto para los controles de plantas sanas como para las muestras de plantas infectadas.**

**Otros investigadores (Permer y col., 1990) obtuvieron un AcM que reacciona fundamentalmente con aislados severos del virus, lo cual resulta de gran utilidad en la diferenciación de aislados del CTV (número de patente 5104789 País EE.UU. C.I. G01N 435/5. Monoclonal antibodies which discriminates between strain of Citrus Tristeza Virus).**

**En 1991, Tsai y col. Obtuvieron ACMs contra aislados del CTV de Taiwan. Los estudios realizados demostraron que al menos uno de ellos es específico contra un epítipo de la proteína de cubierta del virus, que no había sido descrito previamente.**

**Además de los ya mencionados, Zebzami y col. Informaron en 1993 la obtención de otros AcMs contra el CTV, empleando fuentes virales de Marruecos. Los anticuerpos obtenidos reaccionaron frente a todas las cepas de Marruecos que se probaron, así como frente a un gran número de aislados de la colección internacional de aislados del CTV.**

**Se han realizado estudios del reconocimiento de los diferentes aislados, por parte de los ACMs obtenidos hasta el presente, los cuales han demostrado que ninguno de ellos por sí sólo reconoce todos los aislados del virus, aunque unos son de mayor**

espectro de reacción que otros. No obstante, si se realizan combinaciones entre ellos se puede lograr un reconocimiento total. Este es el caso de la mezcla de AcMs obtenida en España (3DF1+3ca5), que se utiliza con fines de diagnóstico (Cambra y col., 1990).

El objetivo de la presente invención fue obtener un AcM, para el diagnóstico del CTV, que tuviera un amplio espectro de reconocimiento de los aislados del virus.

El AcM 3C1F10 contra el CTV, obtenido en Cuba, ha sido probado frente a 120 aislados del virus, que representan un amplio rango de intensidad de los síntomas de tristeza, que varían desde asintomáticos hasta las variantes más severas de esta enfermedad. De acuerdo con estos ensayos, el AcM resulta ser de amplio espectro, por lo que puede ser utilizado en el diagnóstico del CTV.

La novedad de la invención consiste en que se obtuvo un ACM, que sin combinar con otro tiene un amplio espectro de reacción, lo cual es útil para el diagnóstico del CTV. Además es una herramienta importante para la caracterización de aislados del virus, ya que ha sido demostrado que su reacción frente a un panel de aislados del CTV es única.

Como se puede apreciar en la tabla 1, el AcM 3C1F10 tiene un patrón de reconocimiento totalmente a los demás anticuerpos, lo que evidencia que estos reconocen distintos sitios de la proteína de cubierta del CTV.

Para la obtención de los hibridomas secretores de los anticuerpos de interés, se inmunizaron ratones Balb/c con una solución parcialmente purificada (SPP) del CTV. Una vez logrado el título adecuado en el suero de los ratones, estos se sacrificaron para fusionar la suspensión de células del bazo con células de mieloma de ratón (X63.Ag.8.653), empleando Polietilenglicol (PEG) como agente fusionante. Los híbridos se seleccionaron utilizando un medio selectivo. Seguidamente fueron clonados y reclonados por el método de dilución limitante hasta obtener células (hibridomas) productoras de anticuerpos contra el CTV. Se obtuvo el líquido ascítico inyectando los hibridomas en los ratones por vía intraperitoneal.

Para la titulación de anticuerpos y selección de los híbridos secretores se empleó el ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto. Por otra parte la detección del CTV, utilizando el AcM 3C1F10, se realizó mediante un ELISA sandwich de doble anticuerpo (DAS). Ambos tipos de ELISA se describen en los ejemplos correspondientes.

## **EJEMPLO 1**

### **Generación de hibridomas secretores de AcM contra el CTV.**

Para la obtención de células hibridomas secretoras de AcMs contra el CTV, se inmunizaron ratones Balb/c con una solución parcialmente purificada (SPP) del CTV. En el día 0 del esquema de inmunización los ratones Balb/c, recibieron por vía intraperitoneal 0,2 ml de una mezcla de SPP y adyuvante completo de Freund 1:1 (v:v). En los días 15 y 30 los animales recibieron iguales dosis, pero con

adyuvante incompleto. Una semana más tarde se ensayó el título de anticuerpos por medio de un ELISA (ver sección ELISA indirecto) y 15 días después el ratón con mejor título recibió 0,1 ml de una dilución 1:1 (v:v) de SPP y solución salina tamponada con fosfatos (PBS) pH 7,4.

Procedencia	Aislados	Clasificación	3C1F10
E.E.U.U.	B002	Débil	+
	B147	Débil	+
	B51	Débil	+
	B52	Débil	+
	B151	Moderado	+
	B111	Moderado	-
	B5	Moderado	+
	B003	Severo	+
	B152	Severo	+
	B004	Severo	+
	B148	Severo	+
	B28	Muy severo	+
	B153	No datos	+
Japón	B188	Débil	+
	B190	Débil	-
	B029	Débil	-
	B186	Débil	+
	B31	Severo	+
	B30-2	Severo	+
	B30-1	Severo	+
	B214	No datos	+
	B215	No datos	+
	B189	No datos	+
Brasil	B016-1	Débil	+
	B17	Severo	+
	B13-1	Severo	+
	B13-8	Severo	+
	B14-2	Muy severo	+
	B17-3	Muy severo	+
India	B222	Débil	+
	B219	Severo	+
	B224	Severo	+
	B220	Severo	+
	B227	Muy severo	+
	B176	No datos	+

Procedencia	Aislados	Clasificación	3C1F10
Israel	B22	Débil	-
	B26-1	Moderado	+
	B23-9	Severo	+
	B23-5	Severo	-
	B24	Severo	+
	B200	Severo	
España	B35	Débil	-
	B032	Moderado	+
	B158	Severo	+
	B160	Severo	+
	B053	Muy severo	+
	B33	Muy severo	+
Colombia	B129	Débil	+
	B274	Débil	+
	B125	Débil	+
	B128	Severo	+
	B124	Severo	+
Sudáfrica	B7	Débil	+
	B080	Débil	-
	B07-1	Moderado	-
	B8	Severo	+
Taiwan	B213	Severo	+
	B253	Severo	+
	B233	Muy severo	+
	B40	No datos	+
China	B144	Débil	+
	B063	Débil	+
	B67	Severo	+
Indonesia	B256	Débil	+
	B205	No datos	+
Costa rica	B182	No datos	+
	B180	No datos	+
Perú	B135	Severo	+
Australia	B187	Severo	+
Hawái	B10	Severo	+
Filipinas	B143	Débil	+

La fusión celular se realizó de acuerdo con el método sugerido por J. W. Goding (1986), utilizando la línea X63.Ag.8.653 como mieloma parental a una relación células de mieloma: esplenocitos de 1:10 con PEG 4000 como agente fusionante. El medio de selección fue DMEM suplementado con 10% del mismo suero.

## EJEMPLO 2

**Obtención y caracterización de AcM contra el CTV.**

Se obtuvo el líquido ascítico inyectando los hibridomas en los ratones por vía intraperitoneal. La determinación de la subclase del AcM se realizó mediante inmunodifusión radial simple, utilizando los anticuerpos comerciales de las subclases correspondientes (Ouchterlony, 1978, Handbook of Experimental Immunology, 1960).

El título de anticuerpos (en ascitis o AcMs purificados) se determinó por ELISA indirecto para el cual se reunieron placas de poliestireno con SPP del virus y con una preparación similar de plantas no infectadas en dilución 1:100 (v:v) en tampón carbonato.bicarbonato 0.05 M pH 9,6. Se incubó toda la noche a 4<sup>0</sup>C y se añadió el suero de los animales en diluciones 1:1000, 1:5000 y 1:0000 (v:v). En este paso fueron probados también los sobrenadantes de cultivo diluidos 1:2 (v:v). El conjugado empleado fue IgG antirratón-fosfatasa alcalina (Sigma) en dilución 1:1000 (v:v). En ambos pasos se incubó durante dos horas a 37<sup>0</sup>C. Se empleó 1 mg/ml del sustrato (p-nitrofenilfosfato) en tampón dietanolamina pH 9.8. La lectura de la D.O. a 405 nm se realizó a los 20 minutos.

La purificación de los anticuerpos se realizó a partir de líquido ascítico, que se diluyó v:v con tampón glicina 1.5M, NaCl 3M pH 8.9. Luego se empleó cromatografía de afinidad en proteína A-sefarosa CL-4B. La elución se realizó con un gradiente de tampón Citrato 0.1M de pH=6 a pH=3. Las fracciones obtenidas se controlaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) según Laemmli (Nature 227, 1970), y se midió su actividad biológica por ELISA indirecto. La concentración de la IgG se midió en un espectrofotómetro, utilizando un coeficiente de extinción de  $1.0 \text{ mg mL}^{-1} = 1.5 \text{ d:O}$  a 280nm de acuerdo a Torres y col. (J. Chromatography 499, 1990). El punto isoelectrico se determinó por focalización isoelectrica en gel de poliacrilamida según Laas ) Protides of the Biological Fluids 27, 1979). En la tabla 2 se muestran los resultados de la caracterización del AcM 3C1F10.

Tabla 2. Caracterización del AcM contra el CTV.

Ac. monoclonal	3C1F10
Título ELISA-IND	E5
Subclase de Ig	IgG2a
Punto Isoeléctrico	6.5-6.9

### EJEMPLO 3

Detección del CTV por ELISA DAS empleando el AcM 3CF10.

Se recubrieron placas de poliestireno con AcM a una concentración de 1 mg/ml y se incubaron durante 4 horas a 37<sup>0</sup>C. Seguidamente se añadieron extractos crudos de plantas preparados 1/5 (p/V), en SSTF +0.5% de Tween 20. El conjugado (AcM marcado con Fosfatasa Alcalina), se empleó a una dilución de 1:6000n y se incubó a 37<sup>0</sup>C durante 3 horas. El sustrato se empleó a 1 mg/ml y la lectura se realizó a las 3 horas.

Preparación del conjugado: Se realizó según el método descrito por Clark y Adams (J. General Virology 34, 1977) empleando 5 mg de fosfatasa alcalina tipo VII (Sigma) por cada 2 mg de AcM. Se añadió glutaraldehído a una concentración de 0.05% y albúmina de suero bovino. Se filtró de 0.45 mm, se le añadió glicerol v:v y se conservó a -20<sup>0</sup>C.

El acM obtenido permite elevar el nivel técnico del diagnóstico del CTV, ya que aumenta la especificidad del ensayo de detección del virus.

## **REIVINDICACIONES**

- 1. El anticuerpo monoclonal 3C1F10 contra el CTV se caracteriza por ser de subclase IgG<sub>2a</sub>, reconoce el 95% de los 120 aislados de virus con diferente intensidad de los síntomas, frente a los que se ha probado y reconoce un epítipo (región de la proteína de cubierta del virus) que no había sido detectado previamente.**

## **RESUMEN**

**La presente invención se relaciona con la rama de la Biotecnología y en particular con la obtención de un anticuerpo monoclonal para el diagnóstico del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).**

**Consiste en un anticuerpo monoclonal (AcM específico para la detección del virus, que se caracteriza por ser subclase IgG<sub>2a</sub> y reconocer el 95% de los aislados del CTV frente a los que se ha probado. Además reconoce un epítipo (región de la proteína de cubierta del virus) que no había sido detectado previamente. El AcM obtenido puede ser utilizado en el diagnóstico y en la caracterización de aislados del CTV.**