



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS**

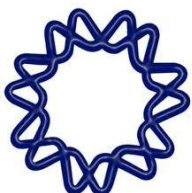
**USO DE FLOCULANTES EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE
OVARIO DE HAMSTER CHINO (CHO) COMO ESTRATEGIA
DE CLARIFICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

I.B.Q. Itzcóatl Arturo Gómez Aquino



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Octavio Tonatihu Ramírez Reivich

Cuernavaca, Mor.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich.

Se agradece a la M. en C. Vanessa Hernández por su asesoría en cuanto al análisis de glicosilación y cultivo celular. A la empresa PROBIOMED por donar amablemente eritropoyetina y la línea celular CHO-K1.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca Salud-126663, y al proyecto PAPIIT-UNAM-224409.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez por permitirme formar parte de su grupo de investigación, y permitirme crecer como persona y como profesional.

A los miembros de mi comité tutorial por el tiempo dedicado durante mi formación académica:

Dr. Enrique Galindo

Dr. Edmundo Castillo

A los miembros del jurado por su interés y comentarios, los cuales contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo.

Dr. Gerardo Corzo

Dra. Marcela Ayala

Dr. Iván Martínez Duncker

Dr. Efrén Hernández

Dr. Yimy Mena

A la Dra. Laura Palomares por sus aportaciones, a la M. en C. Vanessa Hernández, M. en C. Ana Ruth Pastor y Lic. Karin Levi por su importante asistencia técnica y académica.

A mi padre, que sé que en cada momento de mi vida me acompaña, este logro también es tuyo
A mi madre, que ha sido mi fuente inagotable de apoyo y comprensión
A mi hermana, compañera y gran amiga
A mi abuelo, que ha sido y siempre será un ejemplo a seguir en mi vida
A ti Alma, que me has acompañado y apoyado en esta última etapa

A mis amigos
Gilda, Héctor, Alexis, Baldemar,
Ale, Lilita, Sara, Bere, Jesús,
Gheorghe, Cuitlahuac, Checho, David,
Esteban, Luis, Ori, Ioatzin, Lilita Carreño,
Germán, Antonino, Lilita, Mabel, Ricardo,
William, Vane, Alicia, Martha,
René, Caleño, Karin, Ramsés, Mauricio,
Gaby, Carlos, Irving, Ema, Cuevas,
Mónica, Hanna y Nadia.

Gracias por acompañarme en esta aventura.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Biofarmacéuticos	5
2.1.1. Mercado.....	6
2.2. Sistemas de expresión	8
2.2.1. Modificaciones post-traduccionales (MPTs)	12
2.2.2. Contaminantes	17
2.2.3. Heterogeneidad de cargas	19
2.3. Métodos de separación de células.....	20
2.4. Modelos de estudio	29
2.4.1. Eritropoyetina	29
2.4.2. Anticuerpos monoclonales	31
3. HIPÓTESIS.....	39
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo general	39
4.2. Objetivos específicos.....	39
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1. Cultivos celulares.....	43
6.2. Mantenimiento de células	44
6.2.1. Banco celular	44
6.2.2. Descongelamiento de células	44
6.3. Cinéticas de sedimentación	44
6.4. Análisis del sobrenadante.....	46
6.4.1. Concentración y viabilidad celular.....	46
6.4.2. Cuantificación de proteína del hospedero	46
6.4.3. Cuantificación de ADN.....	47
6.4.4. Cuantificación de proteína recombinante	48

6.5. Purificación de AcMo.....	49
6.5.1. Cuantificación de la concentración de AcMo purificado	49
6.6. Detección de glicanos.....	49
6.6.1. Asialoeritropoyetina	50
6.7. Interacción proteína – polielectrolito	51
6.8. Identificación de poblaciones y estructuras de glicanos	52
6.8.1. Análisis de glicanos por HPLC de fase normal	52
6.8.2. Tratamiento con exoglicosidasas	54
6.8.3. Nomenclatura de glicanos.....	55
6.8.4. Análisis de glicanos por cromatografía de intercambio aniónico débil en HPLC	55
6.9. Análisis estadístico	57
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
7.1. Caracterización de la línea celular.....	58
7.2. Cinéticas de sedimentación	59
7.2.1. Remoción de proteína del hospedero.....	63
7.2.2. Remoción de ADN	65
7.2.3. Selección del mejor polímero para la caracterización subsecuente	66
7.3. Caracterización de glicoproteínas modelo	68
7.3.1. Determinación de pureza y presencia de glicanos	68
7.3.2. Determinación de diámetro hidrodinámico.....	70
7.3.3. Determinación de poblaciones con carga	71
7.3.4. Determinación de patrones de glicosilación.....	72
7.4. Interacción proteína – polielectrolito	78
7.4.1. Determinación de interacción proteína – polielectrolito por WAX-HPLC y HPLC-FN ..	79
7.4.2. Determinación de interacción proteína – polielectrolito por DLS	81
7.5. Integración del uso de polielectrolito a un proceso de purificación de AcMo	84
8. CONCLUSIONES	87
9. PERSPECTIVAS	89
10. BIBLIOGRAFÍA	90
11. APÉNDICE A	100
12. APÉNDICE B	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de N y O glicosilación	14
Figura 2. Estructuras de N-glicanos	15
Figura 3. Esquema de una centrifuga de discos	23
Figura 4. Mecanismos de retención de partícula por un filtro profundo	24
Figura 5. Mecanismos de floculación	26
Figura 6. Proceso de purificación estándar de un biofármaco	28
Figura 7. Proceso de producción de eritropoyetina humana recombinante	30
Figura 8. Estructura eritropoyetina	31
Figura 9. Proceso de producción de un anticuerpo monoclonal.....	33
Figura 10. Esquema de un anticuerpo monoclonal IgG	34
Figura 11. Estrategia experimental	41
Figura 12. Curva de calibración tiempo de retención – unidades de glucosa.....	53
Figura 13. Acción de glicosidasas.....	54
Figura 14. Cromatografía WAX-HPLC.....	56
Figura 15. Cinética de crecimiento de la línea celular CHO-K1 53.....	59
Figura 16. Cinética de sedimentación y cálculo de K_s	60
Figura 17. Resumen de parámetros de floculación para todos los floculantes probados.....	61
Figura 18. Concentración de proteína del hospedero en el sobrenadante.....	64
Figura 19. Remoción de ADN.....	66
Figura 20. Pureza y detección de carbohidratos de Xolair.....	68
Figura 21. Pureza y detección de carbohidratos de eritropoyetina y asialoeritropoyetina	69
Figura 22. Diámetro hidrodinámico de proteínas y polielectrolito.....	70
Figura 23. Cromatogramas de intercambio aniónico débil.....	71
Figura 24. Distribución porcentual en eritropoyetina de poblaciones de carbohidratos con carga	72
Figura 25. Perfil de glicosilación de Xolair	73
Figura 26. Perfil de glicosilación de eritropoyetina	76
Figura 27. Cromatogramas WAX-HPLC y HPLC-FN de interacción proteína-polelectrolito.....	80
Figura 28. Interacción IgG-PEI por DLS.....	81
Figura 29. Interacción EPO-PEI y aEPO-PEI por DLS.....	83
Figura 30. Purificación de anticuerpo monoclonal por cromatografía de afinidad.....	84
Figura 31. Gel de SDS-PAGE de las etapas purificación de anticuerpo monoclonal	85

Figura 32. Perfil de glicosilación de anticuerpo purificado.....	86
Figura 33. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-L-Ornitina	100
Figura 34. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-L-Arginina	101
Figura 35. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-L-Histidina.....	102
Figura 36. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-Lisina DL	103
Figura 37. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-Lisina.....	104
Figura 38. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Polietilenimina	105
Figura 39. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Kemira C-573	106
Figura 40. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Kemira C-581	107
Figura 41. Cinéticas de sedimentación de células CHO con tetraborato de sodio	108
Figura 42. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Superfloc 90	109
Figura 43. Diámetros hidrodinámicos de interacción proteína-políelectrolito	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventas de biofarmacéuticos basados en proteínas recombinantes	7
Tabla 2. Sistemas de expresión utilizados para la producción de biofarmacéuticos	8
Tabla 3. Características de las plataformas utilizadas para la expresión de biofarmacéuticos	9
Tabla 4. Significancia médica de impurezas posiblemente presentes en biofarmacéuticos	19
Tabla 5. Anticuerpos monoclonales aprobados para uso terapéutico con mayores ventas	32
Tabla 6. Actividad biológica de carbohidratos presentes en IgG.....	37
Tabla 7. Polímeros utilizados	42
Tabla 8. Atributos de polímeros utilizados	67
Tabla 9. Distribución porcentual en Xolair de poblaciones de carbohidratos.....	73
Tabla 10. Estructuras de carbohidratos presentes en Xolair.....	74
Tabla 11. Estructuras de carbohidratos presentes en eritropoyetina.....	77

ABREVIATURAS

%RTP	Porcentaje relativo al total de la población
AcMo	Anticuerpo monoclonal
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aEPO	Asialoeritropoyetina
BHK	Riñón de hámster bebé
Asn	Asparagina
Bórax	Tetraborato de sodio
CDC	Cascada de complemento
CDM4CHO	Medio químicamente definido 4 - para CHO
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
Células NK	Células Natural Killer
CHO	Ovario de hámster chino
DEAE	Dietilaminoetil
DH	Diámetro hidrodinámico
DIG	Digoxigenina
DMSO	Dimetil sulfoxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
EPO	Eritropoyetina
Fab	Fracción variable de un anticuerpo
Fc	Fracción conservada de un anticuerpo
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
PCH	Proteínas de la célula hospedadora
HPLC - FN	Cromatografía líquida de alta presión en fase normal
IMAC	Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados
Ks	Constante de sedimentación
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MPTs	Modificaciones post-traduccionales
NBT/BCIP	4-Nitro cloruro de tetrazolina azul / 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
PAA	Ácido poliacrílico
PBS	Buffer salino de fosfatos
PEI	Polietilenimina
pI	Punto isoelectrico
PNGasa-F	N-glicosidasa F
ppm	Partes por millón
rHuEPO	Eritropoyetina humana recombinante
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Ser	Serina

TBS	Buffer salino de TRIS
Thr	Treonina
tPa	Activador de plasminógeno tisular
URF	Unidades relativas de fluorescencia
WAX - HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución con intercambio aniónico débil

G#	Indica el número de galactosas
A#	Número de antenas del glicano
F	Fucosilación
B	Glicano bisectado
Lac#	Indica el número de N-acetil lactosaminas
S#	Indica el número de ácidos siálicos

	Símbolo		Estructura
Fuc		Fucosa	
Gal		Galactosa	
Glu		Glucosa	
Man		Manosa	
GalNac		N-acetilgalactosamina	
GlcNac		N-acetilglucosamina	
Sial		Ácido siálico	
Lac		N-acetillactosamina	

RESUMEN

La purificación de glicoproteínas recombinantes producidas en cultivos de células de mamífero se inicia generalmente con la remoción de las células del medio de cultivo debido a que el producto de interés se encuentra en el sobrenadante, esto se lleva a cabo mediante un proceso denominado clarificación. La clarificación puede efectuarse por medio de tecnologías tradicionales como microfiltración y centrifugación, las cuales pueden afectar adversamente la recuperación por fenómenos como lisis celular, además de requerirse equipos y operaciones de alto costo. Por lo anterior, una tecnología alternativa como el uso de polielectrolitos para mejorar la sedimentación resulta ser de gran interés ya que los costos de materiales y operación pueden reducirse y al mismo tiempo de remover células se pueden reducir otros contaminantes como ADN y proteínas del hospedero. No obstante, los polielectrolitos tienen el potencial de interactuar con la proteína recombinante de interés. En este trabajo se evaluaron diferentes polímeros para seleccionar aquél que proporcionara las mejores condiciones de floculación, definidas éstas como aquellas que generan la mayor remoción celular, mayor remoción de contaminantes y menor tiempo de sedimentación. El mejor polielectrolito de acuerdo a dichas características fue posteriormente aplicado a un cultivo de células de mamífero para identificar los efectos del uso de polielectrolitos sobre la cantidad recuperada y calidad de biofarmacéuticos modelo seleccionados. Además se identificaron las interacciones entre las glicoproteínas utilizadas y el mejor polielectrolito seleccionado para determinar si el uso de este polímero afecta la recuperación primaria del producto mediante la selección de glicofomas particulares.

Se evaluaron diez polímeros de diferente naturaleza (poli-L-aminoácidos, co-polímeros de poliacrilamida y poliaminas), los cuales fueron adicionados en concentraciones de 60 a 100 partes por millón (ppm) a cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO) con diferentes porcentajes de viabilidad (90, 70 y 50%). Con las condiciones anteriores fue posible realizar ensayos para establecer la dependencia de la floculación de células inducida por polielectrolitos con la viabilidad, y por otra parte calcular porcentajes de remoción de células, ADN y proteína del hospedero, además de constantes de sedimentación. De estas pruebas, se seleccionó polietilenimina (PEI) debido a que presenta las mejores condiciones de remoción celular (>95%), un costo atractivo para uso industrial, alta capacidad para remover una alta cantidad de ADN existente en el sobrenadante y características estructurales adecuadas para poder ser removido en etapas subsecuentes de purificación. Para estudiar los efectos del polielectrolito sobre proteínas

con diferentes patrones de glicosilación, se seleccionaron como biofármacos Xolair (un anticuerpo monoclonal, AcMo) y eritropoyetina (EPO). Mientras que este anticuerpo monoclonal es una molécula de alto peso molecular (150 kDa), punto isoeléctrico alto (8-9), con un porcentaje de glicanos en peso menor al 5%, y con bajo o nulo contenido de ácidos siálicos, la EPO es un molécula de bajo peso molecular (39 kDa), punto isoeléctrico bajo (4-5) y altamente glicosilada (alrededor del 40%) y sialidada. Ambas proteínas modelo fueron caracterizadas en cuanto a pureza, diámetro hidrodinámico, presencia de glicanos y perfiles de glicosilación.

Se determinó que cuando la PEI es integrada a un proceso de recuperación primaria y purificación del AcMo, ésta no tiene un efecto sobre la concentración del AcMo en el sobrenadante, y por lo tanto tampoco afecta el perfil de la población de glicanos exhibidos por el anticuerpo. Lo anterior fue corroborado por ELISA (concentración de anticuerpo), dispersión dinámica de luz (interacción proteína-polielectrolito) (DLS) y HPLC de intercambio aniónico débil y HPLC en fase normal para el perfil de glicosilación. Por otra parte, se determinó una interacción EPO-PEI que resulta en una disminución de la concentración de la proteína en el sobrenadante; la interacción se corroboró por DLS. Posteriormente se identificaron las poblaciones de proteína con las cuales interactúa el polielectrolito, las cuales fueron aquellas que contenían entre 3 y 4 residuos de ácidos siálicos. Por lo anterior, se estableció que la carga negativa que el ácido siálico le confiere a la glicoproteína propicia la interacción proteína-polielectrolito. Esto último fue verificado removiendo los residuos de ácido siálico de las cadenas de oligosacáridos, lo cual anuló tal interacción.

Este trabajo contribuye al conocimiento de la operación de clarificación en la producción de glicoproteínas recombinantes producidas por células de mamífero. En particular, se estableció el impacto que puede tener el polielectrolito sobre la recuperación de ciertas glicoproteínas y en específico sobre su patrón de glicosilación, así como los factores que propician tales efectos. Finalmente, los resultados de este trabajo pueden tener implicaciones en el desarrollo de nuevos sistemas de recuperación selectivos para ciertas glicofórmulas.

1. INTRODUCCIÓN

Con el surgimiento de las técnicas del ADN recombinante se han desarrollado medicamentos basados en proteínas recombinantes (biofármacos). La biotecnología farmacéutica ha traído como consecuencia una mejora en lo que respecta a volúmenes de producción e incrementos sustanciales en la seguridad de estos nuevos medicamentos (Palomares & Ramírez, 2007) utilizados para el tratamiento de enfermedades como cáncer, infecciones virales, deficiencias hereditarias, entre otras. En términos monetarios, las ventas de biofarmacéuticos a finales del 2009 reportaron un valor en el mercado de 99 mil millones de dólares, representando un sector importante de la industria farmacéutica la cual percibe alrededor de 600 mil millones de dólares anuales (Walsh, 2010). Entre las proteínas recombinantes más importantes en cuanto a ventas se refiere se encuentran aquellas que están glicosiladas (modificación postraduccional consistente en la adición enzimática de oligosacáridos a un aminoácido específico de la proteína). El proceso de glicosilación depende íntimamente del tipo de célula hospedera utilizada, por lo que la selección del organismo hospedero para la producción de la glicoproteína es pieza fundamental para el proceso. Actualmente, las células más comúnmente empleadas a nivel industrial para la producción de glicoproteínas recombinantes son las de ovario de hámster chino (CHO), las cuales generan un patrón de glicosilación cercano al de los humanos (Palomares & Ramírez, 2007). Las células CHO dominan el mercado de producción de proteínas recombinantes (Wurm, 2005). Entre las glicoproteínas producidas en células CHO podemos encontrar la eritropoyetina (EPO), la cual es la proteína recombinante con mayores ventas a nivel mundial, anticuerpos monoclonales (AcMo), activador de tisular del plasminógeno (tPa), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y enzimas recombinantes como la ADNsa, entre otras.

En el proceso de producción de las proteínas producidas en CHO se pueden identificar de manera general las etapas de cultivo celular y purificación del producto de interés, el cual es generalmente secretado al medio de cultivo.

El presente proyecto de investigación se encuentra enfocado en el primer paso de purificación durante el proceso de producción de proteínas recombinantes, el cual consiste en separar las células y restos celulares para obtener el sobrenadante clarificado en donde se encuentra el producto de interés. Usualmente esta etapa de clarificación se lleva a cabo por medio de operaciones basadas en membranas (filtración profunda y filtración de flujo tangencial) o centrifugación, y en algunos casos cromatografía de afinidad de lecho extendido. Cada uno de estos procesos cuenta con desventajas importantes entre las que se encuentran principalmente el alto costo y elevado tiempo de operación, además de su influencia sobre las características del caldo de cultivo clarificado. Por esta razón este trabajo tiene como objetivo el establecer las bases necesarias para proponer alternativas, que se utilicen en vez de o en conjunción a las tecnologías tradicionales, para mejorar los procesos. La operación resultante idealmente tendrá que ser eficiente, de menor costo, escalable y se deberá evaluar su impacto con respecto al producto de interés para obtener una mayor productividad y calidad del biofármaco de interés.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biofarmacéuticos

El término biofarmacéutico fue utilizado por primera vez en la década de los 80's y fue empleado para describir una clase de proteína terapéutica producida por técnicas biotecnológicas, especialmente por medio de ingeniería genética. Este concepto fue extendido en lo 90's a fármacos basados en ácidos nucleicos para uso en terapia génica. El primer biofármaco en alcanzar aprobación fue la insulina humana recombinante en 1982 y fue producida en *Escherichia coli* (Dingermann, 2008).

En el año 2000, nueve de los diez fármacos líderes eran compuestos de peso molecular bajo, para el año 2008 la situación cambió drásticamente, tres anticuerpos monoclonales (Rituxan®, Remicade® y Avastin®) se encontraban en la misma clasificación junto con otros dos productos basados en proteínas recombinantes (Enbrel® y Epogen®). Se estima que en el futuro esta lista estará conformada por al menos cinco AcMos (Magoon, 2010).

Los biofarmacéuticos se encuentran diversificados en las siguientes categorías, pero todos son agentes terapéuticos basados en proteínas recombinantes (Walsh, 2009).

- Productos basados en anticuerpos monoclonales (utilizados en diagnósticos *in vivo* y con fines terapéuticos).
- Productos basados en hormonas (insulina, glucagon, gonadotropinas y hormona de crecimiento humana).
- Vacunas (contienen un componente antigénico recombinante, p. ej. vacunas con subunidades recombinantes de hepatitis y virus del papiloma humano).
- Interferones, interleucinas y otras citocinas.
- Factores de crecimiento hematopoyéticos (p. ej. eritropoyetina y factor estimulador de colonias).
- Factores sanguíneos recombinantes (factor VIIa, VIII y IX).
- Trombolíticos recombinantes (principalmente activador tisular del plasminógeno).
- Productos basados en enzimas (ADNsa recombinante y glucocerebrosidasa).

Aproximadamente 70% de los biofarmacéuticos que se encuentran actualmente en el mercado son glicoproteínas producidas en cultivos de células de mamíferos, las cuales se emplean debido a su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales (Butler, 2004). Alrededor del 50% de las proteínas producidas en células eucariotas se encuentran glicosiladas (Apweiler *et al.*, 1999). Esta modificación post-traducciona no es factible en sistemas procariontes ya que no cuentan con las estructuras intracelulares (aparato de Golgi y retículo endoplásmico), ni las enzimas necesarias para realizarla. Las glicoproteínas son producidas como un conjunto de diferentes glicofomas, en donde la única diferencia es la estructura de glicano unida a la cadena polipeptídica, la cual es idéntica en todos los casos. El perfil de glicofomas es dependiente de las estructuras de carbohidratos disponibles, los cuales son añadidos durante la co-traducción y modificación post-traducciona, además dicho patrón puede ser afectado por varios parámetros, entre ellos la línea celular (Gooche, 1991), método de cultivo, (Jenkins & Curling, 1994), ambiente extracelular (Jenkins *et al.*, 1996). Se ha reportado que el patrón de glicosilación de estas proteínas es esencial para asegurar su estabilidad estructural y su actividad biológica.

2.1.1. Mercado

Actualmente existen más de 200 biofármacos aprobados para usos médicos generales (y al menos 500 se encuentran en pruebas clínicas), y más de 350 millones de personas han sido tratadas con este tipo de medicamentos (Walsh, 2009). Las ventas de biofarmacéuticos a finales del 2009 reportaron un valor en el mercado de 99 mil millones de dólares, representando un sector importante de la industria farmacéutica la cual percibe alrededor de 600 mil millones de dólares anuales (Walsh, 2010) (Tabla 1).

Existen en total 67 glicoproteínas de uso terapéutico, los cuales representan un tercio de todos los productos aprobados. La categoría que más productos glicosilados aporta son los anticuerpos, de los cuales existen 23 licenciados. El éxito de los anticuerpos monoclonales terapéuticos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y cáncer ha intensificado las pruebas clínicas, y en años recientes, los AcMos han sido el sector con más crecimiento dentro de la industria biofarmacéutica (Pavlou & Reichert, 2004). También es importante mencionar que se encuentran entre los medicamentos más caros, el costo anual por paciente para un tratamiento de cáncer con base en AcMo puede alcanzar 35,000 dólares. La terapia de anticuerpos típicamente incluye dosis altas y frecuentes, lo que combinado con una alta población de pacientes genera una alta demanda (varios cientos de kilogramos por año). De

modo que el costo de manufactura de AcMos es un parámetro crítico para su éxito (Pavlou & Belsey, 2005). En lo que se refiere al costo de producción de este tipo de proteínas, se han manejado varias estrategias, entre las que se encuentra incrementar los títulos de proteína alcanzados en los cultivos de células de mamífero y mejorar las técnicas recuperación y purificación del producto.

Tabla 1. Ventas de biofarmacéuticos basados en proteínas recombinantes.

Categoría	2005*	2006* (Miles de millones USD)	2010**
Anticuerpos monoclonales y fusiones Fc	17.3	23.1	41.2
Eritropoyetina	11.2	12.0	12.8
Insulina	7.6	9.0	13.0
Interferones	6.4	6.8	7.7
Antifibrinolíticos	4.1	4.5	6.3
Inmunoestimuladores	3.9	4.3	5.5
Hormonas de crecimiento	2.2	2.4	2.5
Otros	2.9	3.2	4.7
Totales	55.6	65.3	93.7

*2005 y 2006 basado en ventas

**2010 proyectado con base en los biofármacos existentes en el mercado.

Modificado de: Walsh, 2009.

2.2. Sistemas de expresión

La mayoría de los biofarmacéuticos existentes hoy en día en el mercado son producidos vía ingeniería genética utilizando diferentes sistemas de expresión. La mayoría de las proteínas recombinantes que han sido aprobadas para ser distribuidas se encuentran manufacturadas de manera recombinante en *E. coli*, o en algunas líneas celulares de mamíferos. Este modo de producción se encuentra invariablemente constituido por la introducción de un gen que codifica para la proteína de interés en una cepa altamente caracterizada como *E. coli* K12, las células de ovario de hámster chino K1 (CHO-K1) o células de riñón de hámster bebé (BHK).

El primer sistema de expresión empleado fue la bacteria *E. coli*, de la cual se ha desarrollado un gran conocimiento en cuanto a genética y requerimientos de cultivo. Esta plataforma ha sido ampliamente utilizada para la producción de insulina y hormona de crecimiento humana. Sin embargo, existen otras proteínas recombinantes con valor terapéutico que requieren otros tipos de procesamientos los cuales no pueden ser realizados por *E. coli*, por lo que se han explorado diferentes plataformas para su producción (Tabla 2).

Tabla 2. Sistemas de expresión utilizados para la producción de biofarmacéuticos.

Sistema de expresión	Producto aprobado
<i>E. coli</i> y otros sistemas procariontes (p. ej. <i>Bacillus</i>)	<i>Exubera</i> ® (Insulina)
Levaduras (p. ej. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>Gardasil</i> ® (Vacuna para VPH)
Cultivo de células animales (particularmente líneas celulares de CHO y BHK)	<i>Epogen</i> ® (Eritropoyetina) AcMos como <i>Rituxan</i> ®
Cultivos de células de insecto	<i>Cervarix</i> ® (Prevención para VPH)
Sistemas de expresión basados en plantas	<i>CaroRx</i> ® * (AcMo)
Animales transgénicos (hasta este punto ovejas y cabras)	**

* Aprobado para cuidado de salud, estrictamente no es biofarmacéutico. ** No cuentan con productos aprobados, pero se han logrado expresar proteínas terapéuticas como: tPa, EPO, proteína C y hormona de crecimiento.

Las células CHO son una valiosa herramienta para la producción debido a su capacidad de sintetizar carbohidratos (glicanos) sobre las proteínas de interés (Jayapal *et al.*, 2007). En general, se producen diferentes glicofomas, en donde varían las estructuras de glicanos unidas a un solo esqueleto peptídico de secuencia de aminoácidos conocida. Las células CHO se introdujeron en los años 50's, y se han convertido en el sistema de producción más utilizado para proteínas glicosiladas de uso terapéutico.

Los anticuerpos monoclonales y las proteínas de fusión son la mayor clase de terapéuticos licenciados, y se encuentran producidos principalmente en CHO, células de mieloma de ratón (NS0, SP2/0) e hibridomas (Carter, 2006; Riley, 2006; Dimirov & Marks, 2008).

Una proteína con potenciales sitios de N-glicosilación y que es producida en *E. coli* da como resultado un sitio no glicosilado, mientras que expresando esa misma proteína en un sistema basado en levaduras puede resultar en la unión de una cadena de azúcares con un alto contenido en manosa. En ambos casos, el impacto es negativo sobre la vida media del producto en el torrente sanguíneo y se puede generar una respuesta inmune severa en el paciente (Dasgupta *et al.*, 2007). Los sistemas de producción basados en plantas pueden generar proteínas hiperglicosiladas con un alto contenido en xilosa y fucosa, los cuales son altamente inmunogénicos en humanos (Gomord *et al.*, 2004). Por lo anterior, el uso de células CHO u otras líneas celulares de mamíferos es preferido en la industria, ya que pueden realizar apropiadamente este tipo de modificación post-traducciona, generando un producto con propiedades terapéuticas aceptables. Dicha capacidad convierte a este tipo de células en esenciales para la producción de algunos biofármacos, a pesar de que posean ciertas desventajas (Tabla3).

Tabla 3. Características de las plataformas utilizadas para la expresión de biofarmacéuticos.

E. coli

Ventajas

Su biología molecular se encuentra bien caracterizada.

Altos niveles de expresión de proteína heteróloga, en algunos casos superior al 30% del total de proteína.

Crece rápidamente en medio simple.

Tecnología de fermentación bien establecida.

Desventajas

La proteína de interés se acumula intracelularmente en forma no activa (generalmente como cuerpos de inclusión).

No es capaz de llevar a cabo modificaciones postraduccionales de proteínas (particularmente glicosilación).

Presencia de lipopolisacáridos en su superficie.

<i>Levaduras</i>	<p>Ventajas Los niveles de producción se encuentran alrededor del 5% del total de proteína.</p> <p>Desventajas Capaz de glicosilar proteínas heterólogas humanas pero el patrón usualmente varía al observado de forma nativa o al expresado en células animales.</p>
<i>Células animales</i>	<p>Ventajas Capacidad de realizar modificaciones postraduccionales en las proteínas. La proteína de interés es secretada al medio de cultivo.</p> <p>Desventajas Requerimientos nutricionales muy complejos. Crecimiento lento y alta susceptibilidad a daño físico. Baja productividad.</p>

Existen también casos de proteínas que se encuentran glicosiladas en su forma natural (interferón), y son efectivas de forma medicinal, aun cuando fueron expresadas en *E. coli* y por lo tanto no se encuentran glicosiladas. Sin embargo, otras proteínas no son funcionales de forma terapéutica cuando no están glicosiladas, el caso más prominente dentro de este grupo es la eritropoyetina (EPO), la cual fue producida originalmente en *E. coli* y resultó activa *in vitro*, pero no mostró eficacia *in vivo* (Sasaki *et al.*, 1987).

La ventaja de utilizar líneas celulares de CHO para la expresión de proteínas recombinantes es que se han caracterizado como altas productoras (en su categoría), pero sobre todo por ser líneas celulares transformadas estables y seguras para la manufactura a nivel comercial. Otro beneficio es que este tipo de células tienen la capacidad de crecimiento en suspensión, otras líneas celulares que pueden crecer en suspensión son las derivadas de mieloma de ratón NS0 (Köhler & Milstein, 1975), BHK (Capstick *et al.*, 1962) y HEK-293 (Baldi *et al.*, 2005), aunque esta última al ser una línea celular humana puede procesar N-glicanos de forma distinta a las células CHO (van den Nieuwenhof *et al.*, 2000), lo cual puede generar diferencias en la bioactividad (Haack *et al.*, 1999).

Las células CHO poseen una ventaja adicional: las proteínas recombinantes son secretadas hacia el medio de cultivo de forma natural (Merten, 2006). También cabe destacar que no han sido involucradas en ningún reporte de efectos adversos (Kelley *et al.*, 2007), y aunque existen otras alternativas para la expresión de proteína recombinante que pudiesen ofrecer ciertas ventajas, estas tienen como principal obstáculo para su utilización la aprobación por parte de autoridades regulatorias.

La producción por células CHO puede ser llevada a cabo en cultivos tipo lote y alcanzar una concentración celular de $1-2 \cdot 10^6$ células \cdot ml⁻¹ en 3-4 días, en los cuales se sintetiza el producto y se secreta. El crecimiento de las células se puede extender si las limitaciones nutrimentales son minimizadas (Butler & Jenkins, 1989). Lo anterior puede lograrse mediante la perfusión del cultivo en donde se mantiene una constante alimentación de sustrato y remoción de medio, obteniendo concentraciones celulares de al menos 10^7 células \cdot ml⁻¹ (Butler *et al.*, 1983).

2.2.1. Modificaciones post-traduccionales (MPTs)

En general las proteínas pueden ser susceptibles a más de 100 diferentes modificaciones post-traduccionales (MPTs) (Walsh, 2009). Algunas de estas modificaciones son muy frecuentes (p. ej. glicosilación), mientras que otras son poco frecuentes (p. ej. selenoilación). Algunas son reversibles (p. ej. fosforilación), y también existen irreversibles (p. ej. proteólisis).

Solo algunas MPTs se encuentran asociadas con proteínas de uso terapéutico. La acetilación, fosforilación y la ribosilación son utilizadas para regular procesos intracelulares, incluyendo la expresión de genes y traducción de señales por lo que raramente son relacionadas con biofarmacéuticos. Las MPTs características en los biofarmacéuticos son la glicosilación, formación de puentes disulfuro, carboxilación, hidroxilación, sulfatación, amidación, miristoilación, palmitoilación, isoprenilación, fosforilación e incluyen procesamiento proteolítico. Cabe destacar que la MPT más común es la glicosilación, sin embargo las mencionadas anteriormente son de igual relevancia en proteínas recombinantes de uso terapéutico. Muchos biofarmacéuticos pueden contener dos o más MPTs, por ejemplo, la proteína C activada se encuentra carboxilada, hidroxilada, glicosilada y proteolíticamente procesada además de contar con un puente disulfuro. En general la realización de este tipo de modificaciones a la proteína depende del tipo de célula hospedera utilizada, siendo las células eucariotas superiores las que proporcionan estructuras semejantes a las encontradas en proteínas humanas.

Existen variaciones de las MPTs realizadas en proteínas recombinantes en comparación a los perfiles obtenidos en las moléculas nativas, aunque también se pueden encontrar diferencias en la molécula aún cuando es producida por el huésped natural. Consideraciones de este tipo deben ser tomadas en cuenta ya que el perfil de la población de una misma proteína puede cambiar antes de ser purificada (p. ej. acción de glicosidasas) o durante su purificación (Higgins, 2010; Jenkins *et al.*, 1996; Palomares *et al.*, 2007; Walsh & Jefferis, 2006), aunque la mayor influencia de las características finales dependen de la elección de la línea celular. También es necesario apuntar que el biofármaco puede no ser una réplica exacta de su contraparte natural pero aún así mostrar eficacia y seguridad en las pruebas clínicas, esto demuestra la consistencia del proceso de producción en cuanto a características estructurales.

Glicosilación

La glicosilación es una modificación post-traducciona compleja que requiere de varios pasos consecutivos y la acción de diferentes proteínas (enzimas, sintetasa, transportadores, etc.) y sustratos aceptores y donadores (Figura 1). Este proceso se lleva a cabo principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi. La maquinaria de glicosilación está ausente en *E. coli*, y aunque se encuentra disponible en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* el perfil generado es diferente al producido en células de mamífero. Existen al menos tres tipos de glicosilación: N- (glicanos unidos a un residuo de Asn en una secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina), O-(glicanos unidos a residuos de Ser, Thr ó hidroxilisina), y C-(unidos a un triptófano). La N-glicosilación ha sido la más estudiada y es considerada como la más relevante en la producción de proteínas recombinantes (Brooks *et al.*, 2002; Palomares *et al.*, 2003). La N-glicosilación no ocurre en todo los sitios potenciales, y esta variación causa macroheterogeneidad entre las proteínas (Jones, Krag, & Betenbaugh, 2005). La estructura proteica básica puede ser controlada y dirigida mediante la expresión de las secuencias genéticas apropiadas, sin embargo el control absoluto de las estructuras de glicanos que deben ocupar un sitio en la proteína recombinante no es factible en general.

La N-glicosilación se inicia con la síntesis del glicano precursor sobre el dolicol y posteriormente se efectúa la transferencia de esta molécula a un residuo Asn de una cadena polipeptídica naciente en el RE, esta reacción es llevada a cabo por una oligosacariltransferasa. El proceso comienza en la cara citosólica del RE, donde a través de la acción de glicosiltransferasas se sintetiza el oligosacárido conservado $\text{Man}_5\text{NAcGlc}_2$ unido al portador lipídico dolicol-fosfato (DOL-P). Posteriormente, se lleva a cabo la internalización del oligosacárido y la adición de 4 manosas y 3 glucosas por la acción de otra serie de glicosiltransferasas para obtener el glicano precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2\text{-DOL-P}$. En el RE la oligosacaril transferasa cataliza la transferencia del glicano precursor a la secuencia consenso de N-glicosilación Asn-Xaa-Thr/Ser (Xaa: cualquier amino ácido excepto Pro) (Brooks *et al.*, 2002; Spiro, 2002; Herbert *et al.*, 2005). Después el precursor es remodelado secuencialmente por glicosidasas y manosidasas, hasta sintetizar un glicano con estructura complejo que será exportado al aparato de Golgi, donde ocurre su ramificación mediante la adición de diversos monosacáridos (N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico).

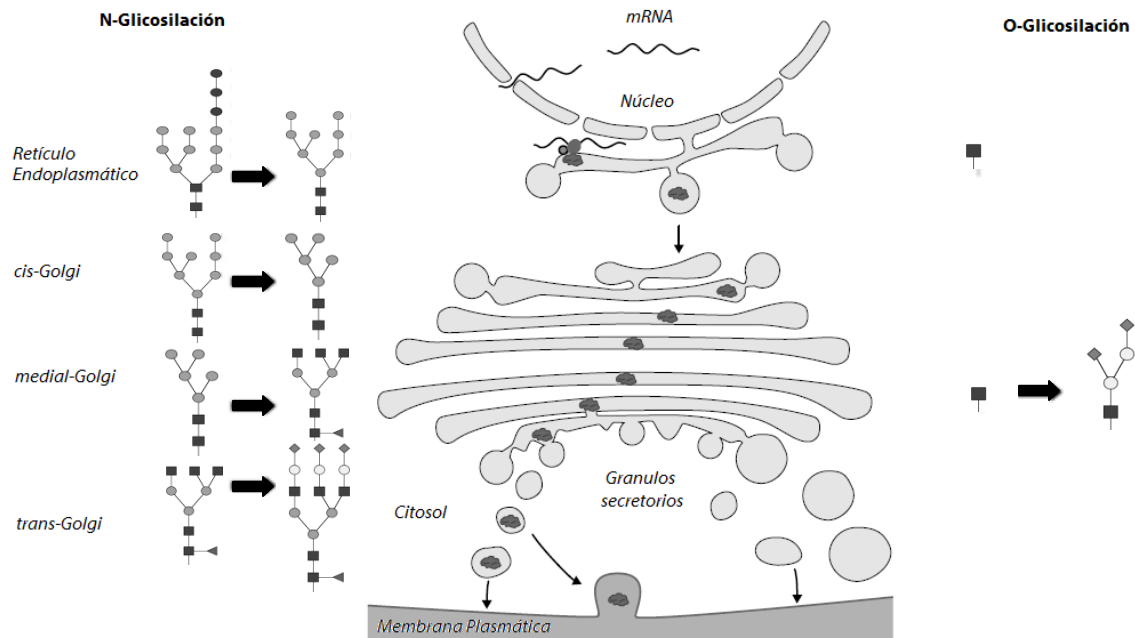


Figura 1. Ruta de N y O glicosilación.

◄ Fucosa ● Glucosa ◆ Acido siálico ○ Galactosa ● Manosa ■ N-acetilglucosamina

Modificado de: Werner, 2007.

Un amplio espectro de estructuras es posible, pero siempre van a compartir el núcleo $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$; dichas estructuras se clasifican en (Figura 2):

- *Alta manosa*: Estructuras que contienen entre 5 y 9 unidades de manosa unidas al núcleo principal.
- *Complejos*: En los cuales, residuos de manosa unidos con enlaces $\alpha 1,3$ y $\alpha 1,6$ en el núcleo son sustituidos por GlcNAc
- *Híbridos*: En los cuales, sólo las manosas unidas al núcleo por enlaces $\alpha 1,3$ son sustituidos por GlcNAc.

Los N-glicanos híbridos y complejos son sintetizados únicamente por animales con sistema circulatorio, pues los eucariotes inferiores carecen de las enzimas ramificantes específicas. Las glicoproteínas humanas además presentan fucosa o ácido siálico en los extremos terminales de algunos N-oligosacáridos (Brooks *et al.*, 2006).

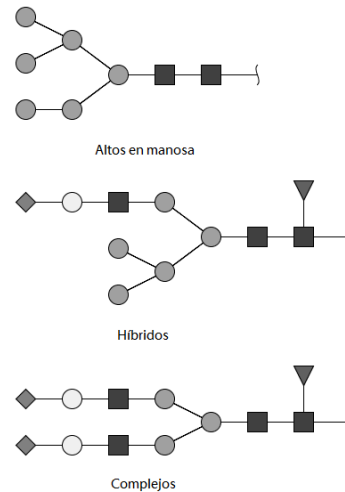


Figura 2. Estructuras de N-glicanos.



Los glicanos en las glicoproteínas pueden exhibir diferentes funciones tales como:

- En algunos casos los carbohidratos promueven la actividad biológica de la proteína, p. ej. la remoción de oligosacáridos en la gonadotropina coriónica humana reduce su habilidad para inducir respuestas en células sensibles; otro ejemplo es la eritropoyetina, la cual disminuye drásticamente su actividad biológica *in vivo* cuando se encuentra desialidada.
- Actúan como sitios de reconocimiento, p. ej. pueden ser blancos para eventos de adhesión celular.
- Incrementan sustancialmente la solubilidad de las proteínas.
- Puede actuar como señalamiento para el tráfico de una proteína hacia su destino final (secreción/organelo).
- Ayudan a regular la vida media de las proteínas, p. ej. las asiloglicoproteínas son retiradas rápidamente del torrente sanguíneo.
- Pueden tener influencia sobre la estabilidad (temperatura y pH) y conformación de varias glicoproteínas.
- Dirigen indirectamente la respuesta subsecuente a la unión de un ligando, p. ej. en el caso de la ADCC provocada por anticuerpos.
- Los glicanos actúan como "escudos" protegiendo la cadena polipeptídica de proteasas.

Los perfiles de glicosilación son específicos del tipo de proteína, el tejido y la especie. Un perfil de glicosilación “no auténtico” en una proteína de uso terapéutico puede activar una respuesta inmune en humanos (Dingermann, 2008), por lo tanto, es necesario que el perfil de glicanos que contenga un bioterapéutico sea similar al de la especie en cuestión. Este perfil es dependiente de la expresión de glicosiltransferasas que se encuentran presentes en el aparato de Golgi de las células; diferencias en la actividad relativa de estas enzimas entre diferentes especies así como diferencias entre la cantidad de sustratos aceptores y donadores (p. ej. diferente proporción en galactosas terminales, fucosa en núcleo y estructuras bisectadas) (Raju *et al.* 2000).

Un factor que puede afectar la glicosilación es la presencia de glicosidasas, ya sea intracelularmente o en el medio de cultivo (Walsh, 2003), por ejemplo, la actividad de sialidasa se puede incrementar debido a lisis celular y la liberación de enzimas citoplásmicas (Gramer & Gooche, 1993; Munzert *et al.*, 1996), esto puede provocar un decremento en las formas sializadas de glicoproteínas que se encuentren en el medio de cultivo. Este problema se puede resolver adicionando inhibidores de glicosidasas, o recuperando el producto antes de que exista daño a la mayor parte de la población celular (Munzert *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2002),

El significado clínico de patrones de glicosilación alterados, es decir, diferencias en la microheterogeneidad solo se encuentra determinado por medio de pruebas clínicas; si el producto supera estos ensayos siendo seguro y efectivo, entonces se evalúa la consistencia lote a lote (Walsh, 2003). Grandes desviaciones entre lotes puede deberse a la presencia de glicosidasas capaces de degradar las cadenas de oligosacáridos enzimáticamente; es por eso que el proceso de purificación debe llevarse a cabo a bajas temperaturas y lo más rápido posible.

Los AcMos tienen un sitio de glicosilación altamente conservado en la cadena lateral de la Asn 297 perteneciente al dominio CH2 de la cadena pesada. Los oligosacáridos presentes en tal sitio de N-glicosilación afectan las propiedades biológicas y farmacológicas de los IgGs, como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Jefferis, 2005; Harris, 2005; Scallon *et al.* 2007). Por ejemplo, ha sido demostrado que la remoción de fucosas en IgGs (afucosilación) mejora la actividad ADCC (Mori *et al.*, 2007).

2.2.2. Contaminantes

El desarrollo de biofarmacéuticos es un proceso complejo, y dado los recursos económicos involucrados es necesario que la manufactura desde el cultivo celular hasta la formulación sea eficiente, esto incluye la remoción o disminución de niveles de impurezas a los permitidos.

La composición del material inicial para purificación (caldo de cultivo) varía significativamente de un producto a otro y aún más importante, depende de la naturaleza de la célula hospedadora, tipo de producción y características individuales de la línea celular de producción. En células de mamífero el producto es secretado en el cultivo, sin embargo los requerimientos nutricionales de este tipo de células convierten el medio de cultivo en una matriz muy compleja compuesta de proteínas séricas, péptidos y carbohidratos. La mayoría de los pasos durante el proceso de purificación son llevados a cabo específicamente para separar la proteína de interés de proteínas adicionales producidas por la célula hospedera. La importancia de estas impurezas radica en su potencial actividad biológica y su antigenicidad, ya que pueden activar una respuesta inmune.

Existen dos categorías de impurezas: impurezas relacionadas al proceso e impurezas relacionadas al producto. La primera categoría se refiere a los derivados del proceso de manufactura, estos pudieran ser componentes del medio, residuos de la célula hospedera y aditivos, por mencionar algunos. En la segunda clase, se encuentran las variantes de la proteína deseada con actividad biológica, seguridad o eficacia distinta a la deseada (p. ej. agregados, degradados, isómeros mal plegados de la proteína o ciertas glicofomas). Las impurezas en biofarmacéuticos se han categorizado comúnmente por cantidad, aquellas que se encuentran alrededor de 0.05% (en el producto final) son considerados como impurezas mayoritarias y si no es posible eliminarlas se debe evaluar su toxicidad, inmunogenicidad y farmacología. Los daños a la salud potenciales debido a impurezas pudieran ser toxicidad, oncogenicidad (proteína y ADN), anafilaxia o reacciones alérgicas o una diferente cinética farmacológica (Tabla 4). Los niveles de cualquier contaminante deben ser reducidos al orden de partes por millón (nanogramo de impureza por miligramo de producto recombinante). Otro inconveniente es que las impurezas pueden afectar a la proteína alterando su actividad o su estabilidad antes de ser administrada.

Proteínas del hospedero

Los niveles de este tipo de impurezas deben ser reducidos para asegurar que aquellas potencialmente antigénicas sean eliminadas, o reducidas a niveles que no puedan generar una respuesta inmune. Dependiendo del tipo de anticuerpos generados, la respuesta fisiológica puede variar entre un efecto transitorio ó severo (p. ej. respuesta inmune prolongada hacia autoantígenos). Los tipos de técnicas empleadas para monitorear la remoción de proteína perteneciente al hospedero son ELISA (del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Western-Blot y SDS-PAGE.

ADN del hospedero

El papel del ADN como contaminante en los productos biofarmacéuticos permanece incierto y aunque no se han reportado efectos clínicos adversos debido a la presencia de éste, se ha establecido como lineamiento que en los productos recombinantes el nivel de ADN residual se debe encontrar en el orden de 10 pg por dosis terapéutica, especificado por la Organización Mundial de la Salud, aunque este valor se ha relajado recientemente. El interés por remover el ADN residual radica en que pudiese contener oncogenes activos los cuales serían administrados al paciente por vía parenteral, pudiendo transformar células y teniendo como resultado el desarrollo de cáncer. En procesos de purificación de proteína a gran escala los ácidos nucleicos pueden causar problemas significativos de taponamiento y caídas de presión, en columnas cromatográficas y membranas de filtración, por incrementos en la viscosidad (Atkinson & Jack, 1973).

Otras impurezas

Residuos cromatográficos como Proteína A, derivados de la resina de afinidad utilizada para la purificación de AcMos entran en esta categoría y pueden ser detectados por métodos inmunoquímicos. Otro ejemplo, son los metales pesados de las columnas IMAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados), y pueden ser visualizados por medio de microscopía de absorción atómica.

Tabla 4. Significancia médica de impurezas posiblemente presentes en biofarmacéuticos.

Impureza	Consecuencia médica
Microorganismos	<i>Establecimiento potencial de una infección microbiana severa - septicemia</i>
Partículas virales	<i>Establecimiento potencial de una infección viral severa</i>
Sustancias pirogénicas	<i>Fiebre, la cual en casos muy severos culmina en muerte</i>
ADN	<i>Pudiera inducir una respuesta inmunológica</i>
Proteínas contaminantes	<i>Reacción inmunológica. Efectos adversos si el contaminante exhibe una actividad biológica no deseada</i>

Modificado de: Walsh, 2003.

2.2.3. Heterogeneidad de cargas

Puede existir una variación en la carga de las proteínas debido a las diferentes MPTs como la desamidación, proteínas incompletas en el N- ó C- terminal (p. ej. heterogeneidad de eritropoyetinas con C-terminal de arginina) y diferencias en el patrón de glicosilación (p. ej. adición de ácidos siálicos terminales). Esta variabilidad en la carga puede ser caracterizada por medio de geles de enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar de zona y cromatografía de intercambio iónico. En algunos casos un alto nivel de sialilación terminal en glicanos es importante en glicoproteínas terapéuticas para evitar receptores de asialoglicoproteínas presentes en el hígado, ya que estos remueven la glicoproteína del sistema circulatorio (Weiss & Ashwell, 1989). Esta interacción de receptores reduce la eficiencia terapéutica, disminuyendo la vida media del fármaco en el sistema circulatorio. El grado de sialilación es variable dependiendo de la línea celular huésped, la glicoproteína y las condiciones cultivo (Jenkins *et al.*, 1996; Joosten & Shuler, 2003; Hossler, 2009).

En particular, la carga neta de los AcMos puede verse afectada debido a modificaciones en la secuencia primaria, cambios en los puentes disulfuro, modificaciones en la N-glicosilación, unión de oligosacáridos a residuos de lisina, desamidación, isomerización, oxidación, e hidrólisis (Perkins *et al.*, 2000; Harris, 2005). El procesamiento incompleto del C-terminal en la cadena pesada es una de las modificaciones más comunes en AcMos recombinantes, esto produce cadenas pesadas carentes de lisina C-terminales. La presencia del residuo en este sitio impacta en la carga neta de la proteína pero no en la estructura o estabilidad (Perkins *et al.*, 2000).

2.3. Métodos de separación de células

El esquema general de producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico se divide en dos partes: un cultivo en donde las células son crecidas para producir la proteína de interés; y posteriormente la separación de las células, proceso también conocido como clarificación del medio de cultivo. Cabe mencionar que los productos de interés en este tipo de procesos generalmente se encuentran en la fracción extracelular. Las células de mamífero son extremadamente frágiles, por lo tanto el diseño de operaciones de recuperación de producto debe tener en cuenta esta consideración. La recuperación primaria es uno de los más grandes retos en la producción de biofármacos, anticuerpos monoclonales y vacunas ya que es necesario obtener el nivel más alto de recuperación de producto en el menor número de operaciones posibles. Al eliminar operaciones unitarias se pueden mejorar rendimientos y disminuir costos de operación.

La demanda en producción de nuevos y efectivos bioterapéuticos ha propiciado nuevas tecnologías, y estrategias asociadas a la purificación. La importancia de la metodología de recuperación radica en que se estima que la purificación involucra del 50 al 80% del costo total de producción (Roque *et al.*, 2004). Por lo tanto, existe gran interés en el desarrollo de nuevas y creativas estrategias que puedan resolver eficientemente la purificación de bioterapéuticos.

Los cultivos de células que contienen una alta concentración celular y de producto se consideran difíciles para ser clarificados, principalmente debido a que el aumento de la densidad celular y los largos tiempos de cultivo provocan la disminución de la viabilidad celular, y por consiguiente la liberación de una gran cantidad de partículas pequeñas (entidades de tamaño sub-micrométrico). Esta situación complica el proceso de clarificación, por lo que en este caso se ha optado por el uso de centrifugas en lugar de membranas (mencionadas posteriormente), ya que estas últimas son susceptibles a ser obstruidas. Dependiendo de la naturaleza del producto se puede realizar un pretratamiento para mejorar las características de la separación y así evitar que las partículas finas obstruyan el flujo y tapen los filtros.

En la industria, la separación de células se realiza en dos etapas (clarificación primaria y secundaria) aunque en algunas ocasiones son necesarias hasta cuatro. El objetivo en esta operación es remover la mayor cantidad de contaminantes, células y restos de éstas, además de alcanzar altos rendimientos y obtener un sobrenadante libre de partículas que pueda ser

introducido en las operaciones subsecuentes, en las cuales se encuentran involucrados equipos de cromatografía. Una consideración importante es que se debe reducir la lisis celular durante este proceso para impedir la liberación de proteínas solubles contenidas en células completas.

Típicamente, la microfiltración de flujo tangencial, la filtración profunda, y en particular la centrifugación son operaciones utilizadas para clarificar suspensiones de cultivos celulares en la producción de proteínas recombinantes para fines terapéuticos (Seewoester, 2006), en ocasiones se usa la combinación de algunas de ellas. Las partículas que son removidas incluyen células completas (<15 μm de diámetro), restos celulares (<1-2 μm de diámetro) y otros componentes dependiendo del sistema utilizado. Frecuentemente se utiliza un filtro profundo y uno o más filtros absolutos para reducir la turbidez del flujo y aumentar su clarificación.

Después de la remoción de biomasa, el principal objetivo en la etapa de recuperación primaria es aislar el producto de las impurezas que se encuentren en la misma fase. En esta etapa de bioseparación es necesario explotar las diferencias entre el producto y las impurezas tales como solubilidad (en agua o en un solvente orgánico), tamaño de partícula, afinidad y carga.

El proceso de purificación desde etapas tempranas puede potencialmente comprometer la integridad del producto, por ejemplo, siendo selectivo o enriqueciendo una variante particular del producto (Jenkins & Curling, 1994). Las proteínas de uso terapéutico son administradas por vía parenteral y por lo tanto requieren de una extrema pureza, de modo que en el proceso de purificación deben ser eliminados elementos no deseados como virus, ácidos nucleicos (o fragmentos), restos celulares, proteína de la célula hospedadora, proteínas de interés con patrón de glicosilación no deseado, entre otros.

Sedimentación

La sedimentación de células es una operación que no requiere equipo ni accesorios costosos y puede ser fácilmente escalable, pero cuenta con la limitante de ser muy lenta, lo cual puede propiciar graves consecuencias como crecimiento microbiano o desnaturalización de la proteína de interés.

En un proceso de sedimentación, la fuerza que gobierna la separación es la diferencia en densidad relativa entre el líquido y las fases sólidas. Esto puede ser mejorado por el incremento de la fuerza de gravedad utilizando una centrifuga, o por el incremento del tamaño y densidad

de partícula por agentes floculantes. Aún si la sedimentación no logra una separación total, puede ser útil como primera etapa de bioseparación reduciendo la cantidad de material que debe ser retirada en las etapas subsecuentes del proceso. La sedimentación por gravedad es empleada frecuentemente en procesos de tratamientos de efluentes para la separación de lodos activados de soluciones acuosas y en la recuperación de levaduras en procesos de producción de etanol.

Centrifugación

Este tipo de bioseparación es una técnica disponible para su aplicación industrial y puede ser utilizada para la concentración de la fase sólida, extracción de productos solubles a contracorriente y en la remoción de impurezas para la clarificación de un producto en solución. Se encuentra comúnmente en las primeras etapas de un bioproceso y es capaz de manejar altos flujos de líquido, altas concentraciones de sólidos y un amplio intervalo de tamaños de partículas. Sin embargo, la elección de una centrífuga para su uso en la industria estará influenciada por parámetros como la necesidad de un proceso estéril, operación continua o en lote y sobre todo la naturaleza del producto.

La centrifugación es actualmente la elección más común como método de cosecha de células en la industria biofarmacéutica (Kempken *et al.*, 1995; Bender & Wolk; 1998), los equipos para esta operación suelen ser de discos, tazón, canasta o tubulares. Esta operación tiene como principio la separación por medio de la diferencia de densidad entre sólidos y el fluido que los contiene. La fuerza centrífuga acelera el asentamiento que normalmente ocurriría durante la sedimentación. En la mayoría de las industrias se utilizan centrifugas de discos (Figura 3) para remover células y restos de éstas (Kempken *et al.*, 1995). Este tipo de centrífuga tiene la ventaja de poder operar de forma continua, de esta forma se mantiene un flujo constante y se disminuye el tiempo de cosecha. También, pueden ser selladas herméticamente trabajando así en esterilidad. De esta manera este tipo de centrifugas constituyen un proceso robusto y escalable aunque no proporciona el grado de separación deseable para poder introducir el sobrenadante en etapas iniciales de captura cromatográfica, por lo que es necesario utilizar posteriormente una microfiltración.

Una consideración importante en el uso de esta operación radica en los esfuerzos cortantes altos a los que las células pueden ser sometidas pudiendo provocar lisis celular, liberar proteínas del hospedero, ADN y proteasas al sobrenadante, lo cual puede reducir la calidad del producto.

Otra desventaja radica en el costo del equipo, particularmente cuando son utilizados para la manufactura a gran escala, además de que consumen una alta cantidad de energía eléctrica.

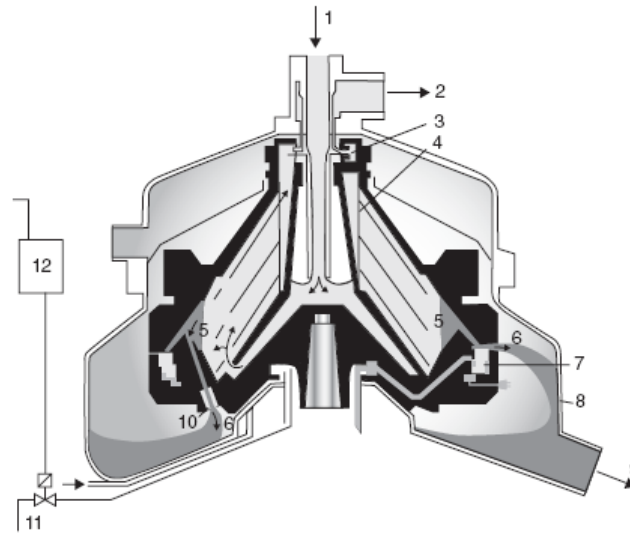


Figura 3. Esquema de una centrifuga de discos.

1. Alimentación, 2. Descarga de líquido clarificado, 3. Bomba centrípeta, 4. Discos, 5. Espacio sólido, 6. Descarga de sólidos, 7. Mecanismo de remoción de sólidos, 8. Receptor de concentrado, 9. Salida de concentrado, 10. Boquillas, 11. Entrada de solución, 12. Control

Modificado de: Rusell *et al.*, 2007.

Microfiltración

Es una operación unitaria para la separación de partículas pequeñas, los límites se encuentran entre tamaños de partícula de 0.1 a 10 μm . La microfiltración puede realizarse en flujo directo y en flujo tangencial. Los parámetros más importantes que determinan la productividad de la microfiltración de flujo cruzado son la presión transmembranal, flujo, tamaño de partícula y viscosidad del líquido.

La microfiltración de flujo tangencial es tan popular como la centrifugación en los procesos de producción de bioterapéuticos provenientes de cultivos de células animales (van Reis *et al.*, 1991; Russotti & Goklen, 2001). Una ventaja que ofrece esta técnica es la de poder retirar el total de partículas del medio, dependiendo del tamaño de poro de membrana utilizado. Por el contrario existen ciertas limitaciones en el transporte de masa debidas a la formación de capas de partículas en la superficie de la membrana, a este fenómeno se le conoce como "fouling".

La velocidad de flujo es un parámetro de gran importancia en el proceso de microfiltración debido a que repercute directamente sobre la calidad del producto y los tiempos de operación. Altas velocidades de flujo provocan esfuerzo cortantes altos sobre las células propiciando ruptura de células y por consiguiente, liberación de contaminantes. Otra consideración importante para la implementación de este tipo de operación es el alto costo de las membranas, además de que estas deben ser cambiadas en un tiempo determinado.

Filtración profunda

Se refiere al uso de un medio poroso (Figura 4) capaz de retener partículas provenientes de la fase móvil a través de una matriz en lugar de sólo la superficie plana (Fiore *et al.*, 1980). Se utiliza cuando el flujo alimentado contiene una alta cantidad de partículas (Singhvi *et al.*, 1996). En tales casos, los filtros profundos pueden remover mayores cantidades de contaminantes insolubles en comparación de otras técnicas debido a que el flujo es sometido a un camino tortuoso en donde más partículas son retenidas en relación a la filtración basada en exclusión de tamaño. Esta operación se lleva a cabo antes de una etapa de microfiltración final. Los filtros profundos empleados en bioprocesos están compuestos típicamente de un lecho fibroso de celulosa o fibras de polipropileno junto con un filtro ayuda (p. ej. diatomita). Algunos filtros profundos se encuentran cargados con polímeros para promover la interacción entre las partículas y la matriz (Knight & Ostreicher, 1998). Esta operación proporciona la gran ventaja de poder retener partículas finas, pero también cabe destacar como una desventaja su alto costo, además de ser susceptibles a taponamiento y debido a esto propiciar caídas de presión en el sistema.

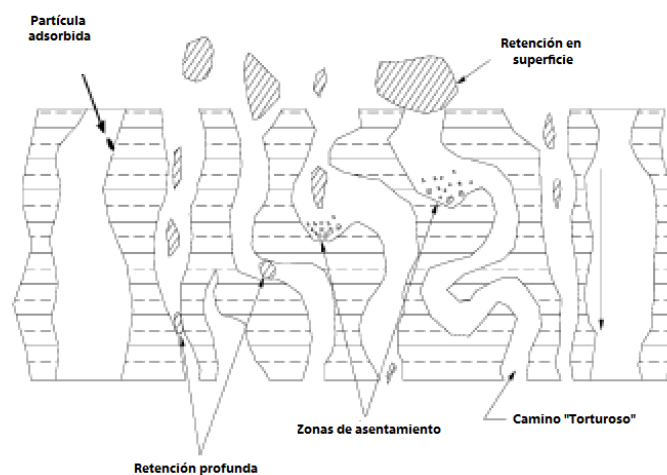


Figura 4. Mecanismos de retención de partícula por un filtro profundo.

Floculación

Una alternativa para evitar el taponamiento de las membranas es aumentar el tamaño de las partículas pequeñas por medio del uso de floculantes, con ello es más fácil llevar a cabo la separación. Esta técnica se ha utilizado para la remoción de células completas, restos celulares y proteínas (Shan *et al.*, 1996; Barany & Szepesszentgyfgyi, 2004). Las partículas son usualmente floculadas antes de la etapa de filtración y/o centrifugación para reducir el paso de partículas no floculadas a través del filtro y así producir una “torta” más porosa y fácil de remover.

La floculación está definida como la agregación de partículas suspendidas, el proceso se lleva a cabo por medio de la estabilización de cargas electrostáticas entre partículas mediante la adición de polímeros, esto propicia que las fuerzas de atracción superen a las fuerzas repulsivas que se encuentran en la superficie de la partícula. Además de polímeros, se han utilizado polielectrolitos, los cuales se unen y neutralizan las cargas (Coffman *et al.*, 2006; Shpritzer *et al.*, 2006).

La iniciación de los flóculos se debe a un mecanismo de adsorción, aparentemente irreversible, de los coloides a lo largo de la cadena de la macromolécula. Este mecanismo, caracterizado por la adsorción de una cadena de polímero en la superficie de una partícula y posteriormente en la superficie de otras partículas agregándolas, se denomina mecanismo de floculación por creación de puentes. La floculación se puede llevar a cabo por otros mecanismos entre ellos (Figura 5), el de neutralización de carga, el cual se encuentra relacionado con procesos en los que el polielectrolito tiene carga opuesta a las partículas, favoreciendo la floculación gracias a fuerzas atractivas de corto alcance. En el caso de que la dispersión coloidal tenga igual carga que el polielectrolito se puede producir la floculación, pese a las fuerzas repulsivas de carácter eléctrico, si el copolímero tiene un alto peso molecular y se añade en una dosis mínima. Esto se debe a que se favorece el mecanismo de floculación por formación de puentes descrito anteriormente. Otros mecanismos de mucho menor interés son los de “parche” electrostático, formación de complejos de polímero y de floculación a partir de polímero libre (Yan *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista cinético, el mecanismo de floculación se puede dividir en 6 etapas: dispersión del polímero en el medio, difusión del polímero hacia la interfase sólido-líquido, adsorción del polímero en la superficie, reorganización de las cadenas de polímero, crecimiento de los flóculos por colisiones y adsorciones entre ellos, ruptura de los flóculos (Carissimi & Rubio, 2005).

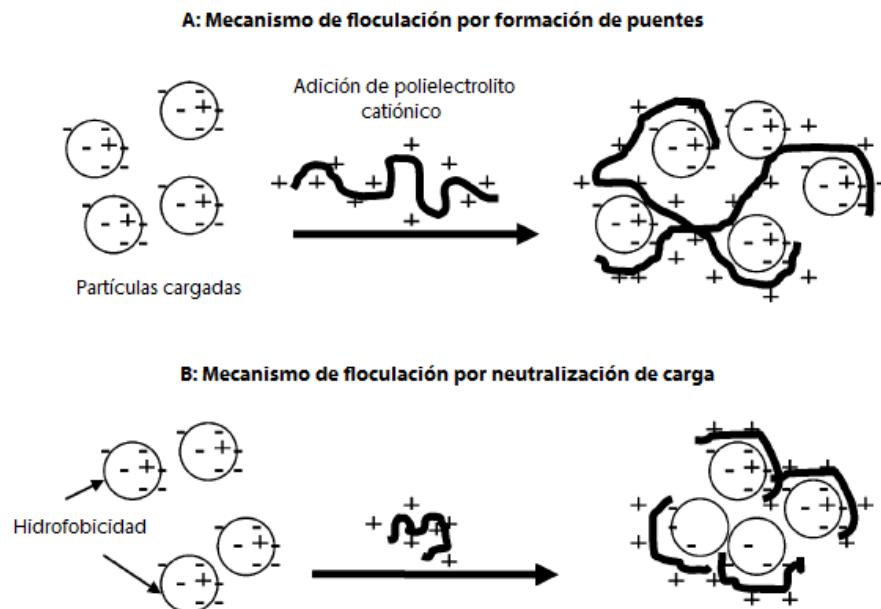


Figura 5. Mecanismos de floculación.

Modificado de: Roush & Lu, 2008.

Conocidos los mecanismos de floculación es posible establecer una relación entre los mismos y las propiedades que deben reunir los polímeros floculantes. Los parámetros más importantes, debido a que afectan la eficiencia de esta operación, son: el peso molecular, la longitud de la cadena y la densidad de carga del polímero, así como la concentración de la suspensión celular y composición del medio de cultivo. Por lo general, cadenas lineales y elevados pesos moleculares aumentan el poder floculante mediante la unión de partículas por puentes poliméricos. Las ramificaciones y su longitud también influyen en la capacidad floculante de un polímero. El tipo y densidad de carga iónica del polímero a emplear son dos variables que dependen del producto o residuo a tratar (Barany & Szepesszentgyfgyi, 2004).

Los polielectrolitos utilizados como agentes floculantes pueden clasificarse en (Shaughnessy *et al.*, 1983):

- **Catiónicos:** Cargados positivamente.
- **Aniónicos:** Cargados negativamente.
- **No iónicos:** No son polielectrolitos en sentido estricto aunque exhiben en solución muchas de las propiedades floculantes de los anteriores.

Los floculantes han sido usados por muchos años para mejorar la filtración de los caldos de cultivo (Belter *et al.*, 1988). Se han reportado el uso de poli-aminoácidos de cadena lateral positiva en el cultivo de células animales para determinar si es posible la agregación celular y su efecto sobre la viabilidad (Aunins y Wang, 1989). Se encuentra reportado que las células poseen cargas negativas en su superficie por la presencia de residuos de ácido siálico en glicolípidos y glicoproteínas de membrana, por lo que en la mayoría de los casos, los reportes de sedimentación explotan esta característica comprobándose que los mejores agentes floculantes son aquellos que poseen una carga positiva (Aunins y Wang, 1989).

En trabajos recientes se ha demostrado que el uso de floculantes combinado con microfiltración contribuye a la clarificación del medio de cultivo de las células animales que contienen "minute virus of mice" (MVM). Este virus es el recomendado como modelo de validación de etapas de remoción viral por la FDA (Han *et al.*, 2002; Wickramasinghe *et al.*, 2004; Akeprathumchai *et al.*, 2004). Riske y colaboradores (2007) estudiaron el uso de quitosan (derivado desacilado de la quitina) como floculante en células NS0 como estrategia para mejorar la clarificación en un proceso de producción de anticuerpos monoclonales en donde se demuestra que este floculante no tiene un efecto adverso sobre el producto. Existen precipitantes reportados en la literatura que pueden ser adaptados para usarse en la manufactura de bioterapéuticos, tal es el caso de ácido poliacrílico (PAA), el cuales es un polímero cargado que promueve la precipitación de proteínas y ácidos nucleicos debido a la interacción con las cargas de las moléculas, creando un compuesto insoluble (Clark & Glatz, 1987). Polímeros como polietilenimina han sido añadidos a soluciones para inducir floculación y mejorar la remoción de restos celulares cuando se utiliza centrifugación como método de clarificación. En el orden de minutos se puede apreciar capas de sobrenadante clarificadas por medio de sedimentación gravitacional. La efectividad de polietilenimina como precipitante de ácidos nucleicos se ha demostrado en diversos trabajos (Milburn *et al.*, 1990; Parker *et al.*, 1990; Cordes *et al.*, 1990; Atkinson & Jack, 1973; Dissing & Mattiason, 1999). Este floculante es un polímero catiónico fuerte, altamente soluble, no tóxico y de bajo costo. Usualmente se utilizan concentraciones de estos polímeros entre 0.01 y 5% (v/v).

Se ha caracterizado que iones de borato, o complejos que contienen bórax, interactúan con azúcares que tienen grupos *cis - diol* contiguos y que por este motivo puede formar una interacción lo suficientemente fuerte para unir polisacáridos de membranas celulares. Bonnerjea y colaboradores (1988) reportaron que el uso de tetraborato de sodio a una concentración de 10 mM y centrifugando a 2,000 g en un sistema que contiene restos celulares de levaduras

disminuye la turbidez del sobrenadante en la misma proporción que cuando se utiliza sólo centrifugación pero a una velocidad de 10,000 g. Es importante mencionar que los residuos de ácidos nucleicos no son afectados por el bórax y por lo tanto no son floculados.

La floculación puede impactar positivamente al proceso de cosecha disminuyendo el contenido de impurezas solubles. Por medio de esta selectividad se disminuye la carga de impurezas suministradas a las etapas de purificación subsecuente. Esto puede tener como consecuencia una mejor relación producto/impurezas, incrementando la capacidad de separación en las columnas cromatográficas, aumentando el tiempo de vida la resina, y disminuyendo el número de etapas cromatográficas requeridas. Teniendo en cuenta estos requisitos, este tipo de operación debe efectuarse en la recuperación primaria, en donde se utilizan principalmente centrifugación o filtración. Debe destacarse que la sedimentación puede ser llevada a cabo en el bioreactor, y posteriormente, remover el precipitado durante la centrifugación o filtración (Figura 6). Alternativamente, el polímero se puede añadir después de que las células han sido removidas, y remover el precipitado resultante mediante otro paso de centrifugación o filtración, con esto se lograría remover impurezas y reemplazar métodos tradicionales de purificación.

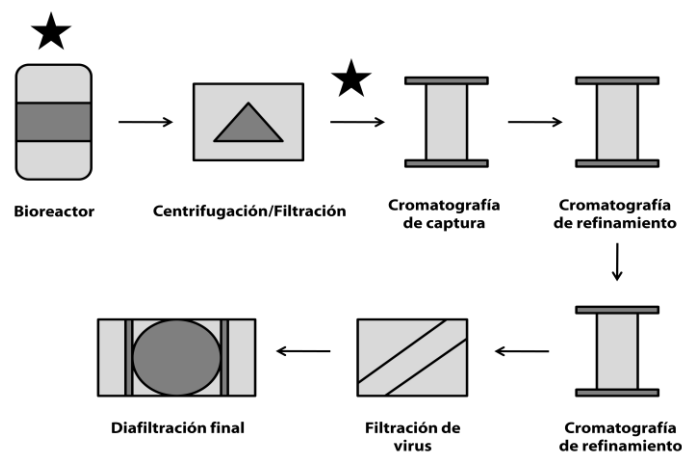


Figura 6. Proceso de purificación estándar de un biofármaco.

* Se identifican las etapas de proceso en las cuales puede llevarse a cabo la floculación

Modificado de: Glynn, 2008.

Aunque se ha descrito como una tecnología en crecimiento en el campo de producción de biofarmacéuticos, la floculación no ha sido utilizada frecuentemente. El interés en esta técnica ha venido en aumento dado que puede ofrecer ciertas ventajas como ser económica, reducir los

niveles de impurezas (PCH, ADN), remover células y restos celulares, y de esta forma reducir la carga de contaminantes en los procesos de purificación subsecuentes (Shukla *et al.*, 2007). Por otra parte, cabe mencionar que no existe ningún reporte en el cual se documente el posible efecto del uso de polielectrolitos en la recuperación primaria sobre la calidad (perfil de glicosilación) del producto de interés. Lo anterior debido a que al tratarse de una población de glicoformas, algunas de éstas pudieran exhibir una variedad de cargas que pudieran interactuar con el polímero utilizado para clarificar el medio de cultivo.

2.4. Modelos de estudio

2.4.1. Eritropoyetina

La eritropoyetina es una hormona y factor de crecimiento hematopoyético que es la principal responsable de estimular y regular la producción de glóbulos rojos en mamíferos estimulando los precursores hematopoyéticos en la médula ósea para diferenciarse. Es una citocina atípica que actúa como hormona y no es sintetizada por ningún tipo de glóbulo blanco (Walsh, 2003). Tiene aplicaciones médicas en pacientes que poseen una velocidad de generación de eritrocitos disminuida, tal es el caso de las personas que padecen anemia (pudiendo ser provocada por fallo renal, artritis reumatoide, cáncer, SIDA, infecciones, etc.). También se ha utilizado para reducir las transfusiones de sangre en adultos en los que se supone complicaciones en una cirugía (Spivak, 2000). Esta glicoproteína actúa incrementando el número de células capaces de diferenciarse en eritrocitos, acelerando la velocidad de diferenciación de éstas e incrementando la velocidad de síntesis de hemoglobina. El gen que codifica para la proteína fue aislado en 1985 a partir de una librería genómica de ADN facilitando así su transfección en células de ovario de hámster chino, por lo que en la actualidad es factible su producción comercial a gran escala, a través de procesos de producción general como el ilustrado en la Figura 7. La eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) se encuentra disponible con diferentes proveedores y por lo tanto en el mercado se pueden encontrar formulaciones aprobadas por la FDA tales como Epogen®, Procrit®, Neorecormon® y Aranesp® entre otras. Este biofármaco es el líder de su clase en términos de ventas, que en el mundo ascendieron a 12 mil millones de dólares en el 2006 (Marchant, 2007).

Estructura

La EPO es una glicoproteína de 39 kDa, constituida por 165 aminoácidos con dos puentes disulfuro y cuatro cadenas laterales glicosiladas que son importantes para la actividad biológica y para la protección de la degradación de radicales oxígeno y el control del metabolismo hepático.

El gen de la EPO codifica inicialmente una pre-proteína de 193 aminoácidos. Durante el proceso de producción y secreción, 27 aminoácidos del extremo N-terminal y posteriormente un residuo de arginina en el extremo C-terminal, son eliminados quedando la proteína madura de 165 aminoácidos (Maiese et al., 2008). Aproximadamente un tercio de su peso molecular se debe a los carbohidratos que contiene, aunque estos pueden variar entre especies (Maiese & Chong, 2005). Las dos formas disponibles para uso clínico (α y β), cuentan con un perfil farmacocinético similar, pero difieren en su contenido de glicanos, la primera contiene un 39% y la segunda un 24% correspondiente a carbohidratos en relación al peso total (Mocini et al., 2007).

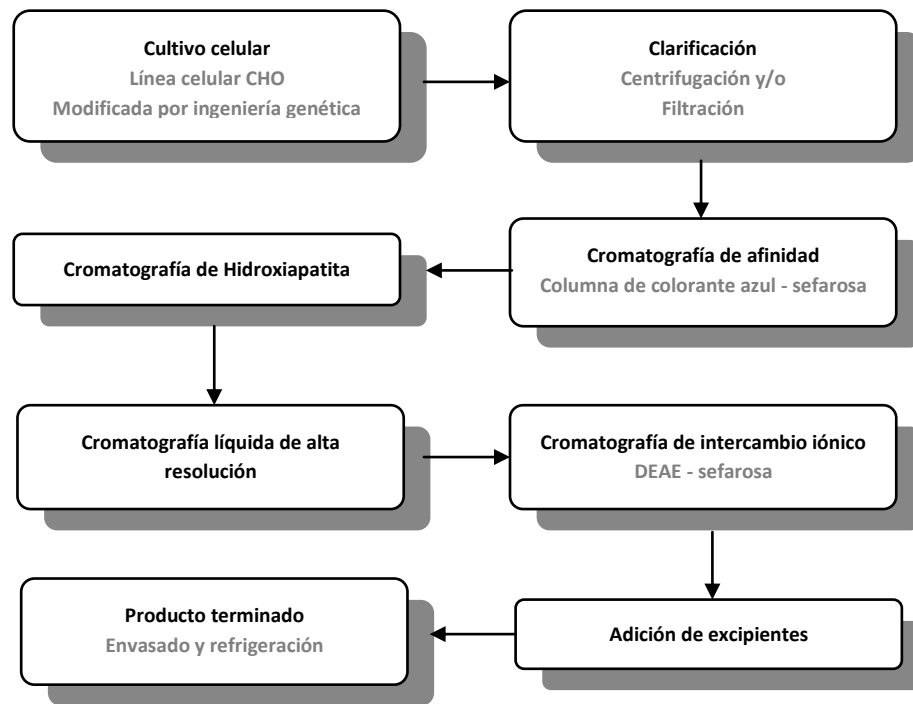


Figura 7. Proceso de producción de eritropoyetina humana recombinante.

Modificado de: Walsh, 2003.

La EPO (Figura 8) cuenta con 4 sitios de glicosilación, 3 de N-glicosilación (Asn24, Asn38 y Asn83) y uno de O-glicosilación (Ser126). El oligosacárido unido en el sitio de O-glicosilación no tiene una función esencial en la actividad biológica de EPO, al contrario de los carbohidratos unidos en los sitios de N-glicosilación, ya que se ha demostrado que la ausencia de estos azúcares elimina la actividad in vivo de la proteína (Jelkmann, 1992).

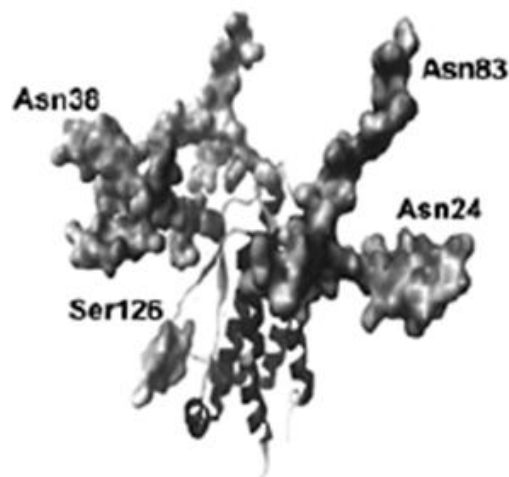


Figura 8. Estructura de eritropoyetina.

Sitios de N-glicosilación: Asn24, Asn38 y Asn83.

Sitio de O-glicosilación: Ser126.

Los glicanos de la EPO contribuyen a su solubilidad, procesamiento, secreción y metabolismo in vivo. La remoción enzimática de los residuos de ácidos siálicos de los glicanos expone a los residuos de galactosas subyacentes, siendo estos susceptibles a la unión de lectinas hepáticas, las cuales promueven la remoción de la proteína del plasma sanguíneo disminuyendo su vida media alrededor de 150 veces (Ridley et al., 1994). Comparaciones entre EPO humana nativa y su forma recombinante producida en CHO revela patrones de glicosilación altamente similares.

2.4.2. Anticuerpos monoclonales

Actualmente las formulaciones basadas en anticuerpos monoclonales son empleadas en un amplio rango de padecimientos médicos, aunque también tienen una gran aportación al campo diagnóstico. En el mercado existen 23 AcMos aprobados por la FDA y más de 300 en pruebas clínicas. Estudios de mercado sugieren que los terapéuticos basados en anticuerpos serán los productos que dirijan el crecimiento de las industrias biofarmacéuticas en los próximos años (Riley, 2006). La venta de AcMos terapéuticos ha crecido de manera exponencial debido al creciente número de pacientes, los tratamientos prolongados y la aplicación de dosis en el orden de gramos. Por lo anterior, los anticuerpos monoclonales representan para la industria farmacéutica el área de crecimiento más grande del mercado de bioterapéuticos (Satho *et al.*, 2002) (Tabla 5). El tipo de anticuerpos predominantes en el mercado son los correspondientes a

las inmunoglobulinas subclase G (IgG). Un proceso de producción de este tipo de glicoproteína se encuentra ilustrado en la Figura 9.

Los anticuerpos de uso terapéutico pueden actuar sobre un amplio número de receptores celulares y citocinas, ya sea para bloquear o aumentar su función, pueden inducir su destrucción por medio de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), o activar la cascada de complemento (Jefferis, 2009).

Tabla 5. Anticuerpo monoclonales aprobados para uso terapeutico con mayores ventas.

Marca (Nombre genérico)	Blanco	Compañía	FDA*	Tratamiento	SE*	Ventas (Miles de millones USD)	
						2009	2010
Remicade (Infliximab)	TNF α	J&J Merck Mitsubishi	1998	<i>Enfermedad de Cohn, colitis ulcerante artritis reumatoide, psoriasis</i>	SP2/0	6.91	7.4
Avastin (Bevacizumab)	VEGF	Roche	2004	<i>Cáncer de colón, pulmón y mama</i>	CHO	5.92	6.9
Rituxan (Rituximab)	CD20	Roche	1997	<i>Leucemia, linfoma, artritis reumatoide</i>	CHO	5.98	6.5
Humira (Adalimumab)	TNF α	Abbot	2002	<i>Enfermedad de Cohn, colitis ulcerante artritis reumatoide, psoriasis</i>	CHO	5.49	5.4
Herceptin (Trastuzumab)	HER2H	Roche	1998	<i>Cáncer de mama</i>	CHO	5.02	5.1
Erbitux (Cetuximab)	EGFR	BMS Merck Serono	2004	<i>Cáncer de colón cuello y cabeza</i>	SP2/0	2.57	3.2
Lucentis (Ranibizumab)	VEGF	Roche Novartis	2006	<i>Degeneración macular húmeda</i>	<i>E. coli</i>	2.43	3.0
Tysabri (Natalizumab)	α -4I	Biogen Idec Elan	2004	<i>Enfermedad de Cohn, esclerosis múltiple</i>	MMC	1.06	1.3
Xolair (Omalizumab)	IgE	Roche Novartis	2003	<i>Asma alérgico</i>	CHO	0.91	1.2
Synagis (Palivizumab)	PF-RSV	Astra Zeneca	1998	<i>Virus respiratorio sincital</i>	NS0	1.1	0.9

* **FDA:** Año de aprobación por la Food and Drug Administration (US); * **SE:** Sistema de expresión; **USD:** dólares americanos; **TNF:** Factor de necrosis tumoral; **VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular humano; **HER:** Factor de crecimiento epidérmico humano; **PF-RSV:** Proteína F del virus respiratorio sincital; **IgE:** Inmunoglobulina E; **4I:** Integrina 4; **CD20:** Clúster de diferenciación 20; **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico; **TNF:** Factor de necrosis tumoral; SP2/0 y NS0: líneas celulares de mieloma de ratón.

Modificado de: Maggon, 2010.

Estructura

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoconjugados expresados en todos los mamíferos. Se han distinguido cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estos difieren en cuanto a tamaño, aminoácidos y composición de carbohidratos de la cadena pesada. La mayoría de los anticuerpos encontrados en el suero pertenecen a la clase IgG. En esta caso, el anticuerpo contiene dos cadenas pesadas de 50 kDa cada una y dos cadenas ligeras de 25 kDa cada una, los cuales se pliegan en 3 largos dominio, dos fragmentos Fab (fragmento de unión) y un fragmento Fc (fragmento cristalizante), estas dos regiones son unidas por una bisagra flexible (Lund *et al.*, 1995). El fragmento Fab puede ser subdividido en pequeñas regiones llamadas dominios variables (en el N-terminal; VL y VH) y un dominio constante (en el C-terminal; CL y CH). Como lo sugieren sus nombres las regiones variables están compuestas por una diversidad de secuencias, mientras que el dominio constante es altamente conservado. El fragmento Fc también tiene dos dominios, formado por dimerización de CH2-CH2 y CH3-CH3 (Figura 10).

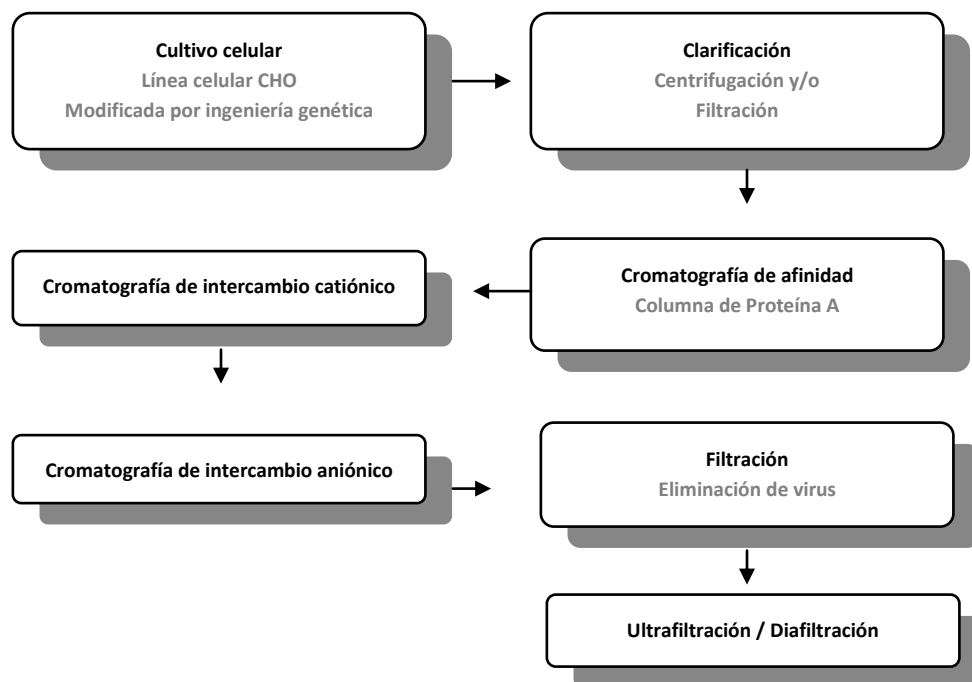


Figura 9. Proceso de producción de un anticuerpo monoclonal.

Modificado de: Walsh, 2003.

El fragmento Fab reconoce al antígeno en el sitio formado por seis segmentos de polipéptidos lineales llamados loops de regiones determinantes de complementariedad (CDR). Estos loops son hipervariables en secuencia y son el sitio de interacción para el reconocimiento del antígeno (Wu & Kabat, 1970). La fracción cristalizable es la que establece las interacciones con los receptores que activarán diversos mecanismos celulares, como la citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (ADCC) y de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), estos eventos se encuentran modulados por los N-glicanos unidos a la asparagina 297 del dominio CH2 (Burton & Woof 1992; Jenkins *et al.*, 1996).

Al analizar los oligosacáridos liberados de IgG policlonales humanas, se observaron al menos 12 estructuras neutras de glicanos unidas a la molécula y una carencia de estructuras sialiladas (<10%), - entre las que predominan las estructuras sin galactosa (G0), con una galactosa (doble G1) y totalmente galactosiladas (G2) (Galbraith *et al.*, 2006; Jefferis, 2009). Por otra parte, se ha establecido que entre el 15 – 20 % de las IgG además del sitio de N-glicosilación conservado en la Asn297, contienen un sitio de glicosilación en las regiones Fab, como resultado de alguna mutación somática durante la selección positiva de unión a antígeno (Jefferis, 2005; Holland *et al.*, 2006).

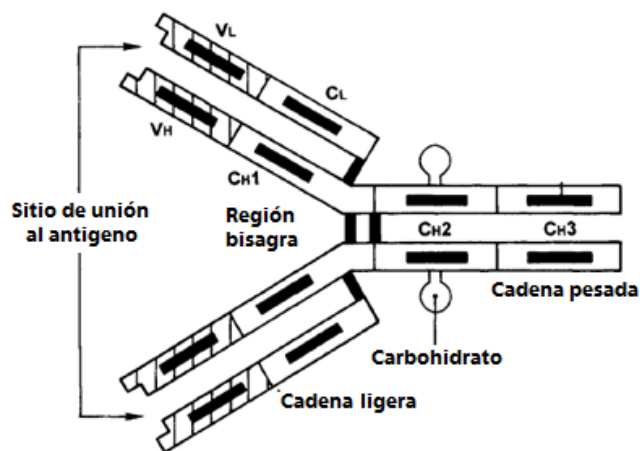


Figura 10. Esquema de un anticuerpo monoclonal IgG.

Modificado de: Kunkel *et al.*, 1998

Microheterogeneidad de anticuerpos

Aunque un AcMo considerado como una sola molécula en realidad este es el caso menos frecuente; debido a la glicosilación de esta proteína se genera una familia de moléculas con cadena polipeptídica idéntica pero con diferente composición de carbohidratos. Usualmente las inmunoglobulinas están N-glicosiladas en la fracción constante como ya se mencionó anteriormente; en algunos casos contienen ácido siálico. Esta situación produce ligeras variaciones en los puntos isoeléctricos de las glicofomas. Debido a lo anterior, cuando los anticuerpos son separados por técnicas cromatográficas en las que se ve involucrada la acción de fuerzas electrostáticas (p. ej. cromatografía de intercambio iónico) la composición de la población puede ser modificada (Perkins, 2000). Esto cobra importancia cuando las inmunoglobulinas son utilizadas como agentes terapéuticos debido a que las funciones efectoras y la farmacocinética está determinada por la Fc y su estado de glicosilación.

Influencia sobre la actividad biológica de la glicosilación de la región Fc de las IgG

Aunque los carbohidratos de la molécula de IgG solo corresponde de 2 a 3% del total de su masa, éste tiene un gran impacto en los mecanismos efectoras que conllevan a la remoción y destrucción de antígenos y patógenos. Estos mecanismos se ven severamente comprometidos cuando la IgG se encuentra desglicosilada (Lund *et al.*, 1993; Sarmay *et al.*, 1992).

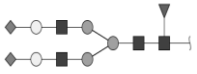


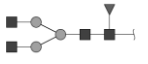


Los ligandos principales para la activación de los mecanismos de eliminación son tres tipos de receptores celulares (Fc γ R) expresados constitutivamente en varios tipos de células hematopoyéticas como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células NK y linfocitos. Los Fc γ Rs relacionan la inmunidad celular y humoral, fungiendo como conector entre la especificidad del anticuerpo y las funciones efectoras de las células. La estimulación de las células a través de los Fc γ Rs puede resultar en la activación de una o más funciones efectoras entre las que destacan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis y liberación de mediadores inflamatorios (Woof & Burton, 2004).

La influencia de la glicosilación sobre la actividad del anticuerpo ha sido evidenciada al observar que aquellas IgG no galactosiladas son más sensibles a degradación proteolítica y son incapaces de activar la vía del complemento; mientras que las estructuras sialiladas son más resistentes a proteólisis pero reducen su afinidad por el receptor Fc γ R y por tanto su citotoxicidad (Jenkins &

Curling, 1994). También se ha demostrado que la ausencia de fucosa incrementa significativamente su unión al receptor de las células NK (natural killer) incrementando la ADCC (Jefferis, 2009). Concretamente, en enfermedades como artritis reumatoide, la ausencia de galactosas terminales favorece la formación de agregados insolubles que provocan inflamación crónica (Jenkins *et al.*, 1996).

En específico ciertos residuos de carbohidratos tienen una participación en la actividad biológica de los AcMos (Tabla 6). La remoción de fucosa del núcleo mejora la ADCC mediada a través de la activación del sitio FcγRIIIa en células NK (Kanda *et al.*, 2006; Shields *et al.*, 2002; Shinkawa *et al.*, 2003), sin embargo de manera natural las moléculas IgG en gran proporción se encuentran fucosiladas. Por otra parte, la presencia de glicanos bisectados en AcMos se ha relacionado con una mejora de su actividad ADCC (Umana *et al.*, 1999), esto ha sido probado en células CHO mutantes que expresan N-acetilglucoamiltransferasa III (enzima necesaria para un carbohidrato bisectado). También se ha demostrado que la presencia de ácido siálico en IgG humanos mejoran sus propiedades anti-inflamatorias (Kaneko *et al.*, 2006), sin embargo este tipo de estructuras sialiladas puede causar la supresión de la actividad ADCC. En mujeres embarazadas los IgG con residuos galactosilados son predominantes y se ha establecido que son preferencialmente transportados hacia el feto (Kibe *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 2000); cabe mencionar que no se ha encontrado correlación entre estas glicofomas y la actividad ADCC (Shinkawa *et al.*, 2003). La galactosa unida al oligosacárido con un enlace $\alpha 1, 3$ es presuntamente inmunogénica en humanos (Galili *et al.*, 1993). Finalmente, la ausencia de galactosas terminales exponen a los residuos de N-acetilglucosamina (G0-F) esto tiene como consecuencia la activación del sistema complemento *in vitro* (Malhotra *et al.*, 1995).

Tabla 6. Actividad biológica de carbohidratos presentes en IgG.

Residuo	Estructura	Actividad biológica (Fuente)
Ácido siálico		Supresión de actividad ADCC - anti-inflamatoria - (Kaneko <i>et al.</i> , 2006)
Galactosa		Preferencialmente transportados a feto vía placenta (Kibe <i>et al.</i> , 1996; Masuda <i>et al.</i> , 2000)
N-Acetilglucosamina bisectado		Actividad ADCC mejorada (Umana <i>et al.</i> , 1999)
N-Acetilglucosamina		Mejora la activación del sistema del complemento. (Malhotra <i>et al.</i> , 1995)
Core de fucosa (-)		Actividad ADCC mejorada (Shields <i>et al.</i> , 2002; Shinkawa <i>et al.</i> , 2003)
$\alpha(1-3)$ - galactosa		Alta inmunogenicidad (Galili <i>et al.</i> , 1993)

Xolair/Omalizumab

Xolair (omalizumab) es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que se une selectivamente a la inmunoglobulina E (IgE) humana. Fue aprobado por la FDA en el 2003, y está indicado para alergia severa relacionada con asma que en algunos casos es inadecuadamente controlada con corticoesteroides para individuos mayores a 12 años. El anticuerpo es un IgG1 κ que contiene una secuencia 95% humana y 5% murina (Presta *et al.*, 1993). En una reacción alérgica, los alérgenos se unen a un IgE y estos a su vez a los receptores Fc-IgE en la superficie de una célula efectora (mastocitos y basófilos) y de este modo se activa la liberación de mediadores como histamina, prostaglandinas y leucotrienos que provocan la inflamación de las vías respiratorias. Omalizumab bloquea la unión de los IgE circulantes a las células, y por lo tanto reduce la liberación de los mediadores inflamatorios (Chang, 2000). El medicamento reduce los niveles de IgE en el suero hasta en un 96% (Milgrom *et al.*, 2009). Es administrado por vía subcutánea, 1-3 inyecciones (dependiendo del paciente) en un periodo de 2-4 semanas. Es desarrollado y comercializado en conjunción por Novartis y Genentech.

El producto es manufacturado inicialmente en cultivo tipo lote alimentado de células CHO. La purificación se lleva a cabo por medio de una combinación de cromatografía de afinidad (proteína A), seguido de cromatografías de intercambio catiónico y aniónico. Finalmente el producto es concentrado por ultrafiltración y diafiltrado. Los excipientes utilizados son sacarosa, histidina y polisorbato 20. Para su comercialización el producto es esterilizado por filtración y liofilizado en viales de 150 mg de proteína recombinante (Walsh, 2006).

3. HIPÓTESIS

Los floculantes catiónicos empleados para separar células de ovario de hámster chino del medio de cultivo metabolizado precipitarán selectivamente glicoproteínas producidas en función de su patrón de glicosilación.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del uso de floculantes en el proceso de recuperación de glicoproteínas recombinantes modelo: un anticuerpo monoclonal (AcMo) y eritropoyetina (EPO), ambas producidas en células de ovario de hámster chino (CHO).

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la línea celular CHO-K1, evaluando las cinéticas de concentración y viabilidad celular, así como de acumulación de ADN y proteína del hospedero en el sobrenadante.
- Efectuar experimentos con diferentes floculantes para seleccionar el que propicie las mejores características de sedimentación de células CHO-K1.
- Determinar la concentración de floculante que propicie la mayor clarificación del medio.
- Establecer el efecto de la viabilidad en la etapa de clarificación cuando se utilizan floculantes.
- Caracterizar el efecto de la floculación sobre la remoción de biomoléculas contaminantes del medio de cultivo metabolizado.
- Determinar si el floculante puede interactuar con la glicoproteína de interés, a través de sus residuos específicos de glicanos, y si tal efecto ocasiona una remoción selectiva que pudiera ser benéfica o adversa en cuestión de recuperación del producto deseado.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La Figura 11 muestra la estrategia experimental llevada a cabo para la realización de este proyecto. Se realizaron cultivos de células CHO en spinner flasks hasta alcanzar densidades celulares en el medio de cultivo simulando el sistema de producción de las proteínas modelo. El cultivo obtenido se utilizó para realizar experimentos de sedimentación con floculantes (Tabla 7) y determinar cuál es mejor y su concentración óptima (ver sección 6.3). Se determinó la viabilidad de las células a la cual es más efectiva la floculación (tiempo de cosecha); también se evaluó la remoción de células a través del tiempo y la reducción de biomoléculas contaminantes en el sobrenadante, tales como ADN y proteínas (antes y después de la floculación).

Los polímeros utilizados en este trabajo fueron seleccionados de manera que existiera una amplia gama en pesos moleculares, puntos isoeléctricos y naturaleza química (poli-L-aminoácidos, co-polímeros de poli(acrilamida) y poliaminas), además de que algunos de estos estuvieran reportados en la literatura como efectivos para la floculación de células eucariotas o procariontas.

Se llevaron a cabo experimentos control en donde se combinó el floculante con la glicoproteína para apreciar posibles interacciones con el polímero que presentó los mejores resultados con respecto a los parámetros ya mencionados.

Por otra parte, se analizó el patrón de glicosilación de las glicoproteínas modelo (AcMo y EPO) para determinar las estructuras de glicanos contenidas en dichas moléculas. Esto sirvió como control, ya que después de la sedimentación celular por floculantes se cuantificó la concentración de la glicoproteína en el sobrenadante por medio de un ensayo de ELISA para determinar si existía una reducción en la concentración de la proteína. Se determinó el patrón de glicosilación para establecer si el floculante precipitaba selectivamente algunas isoformas y cuales no fueron afectadas.

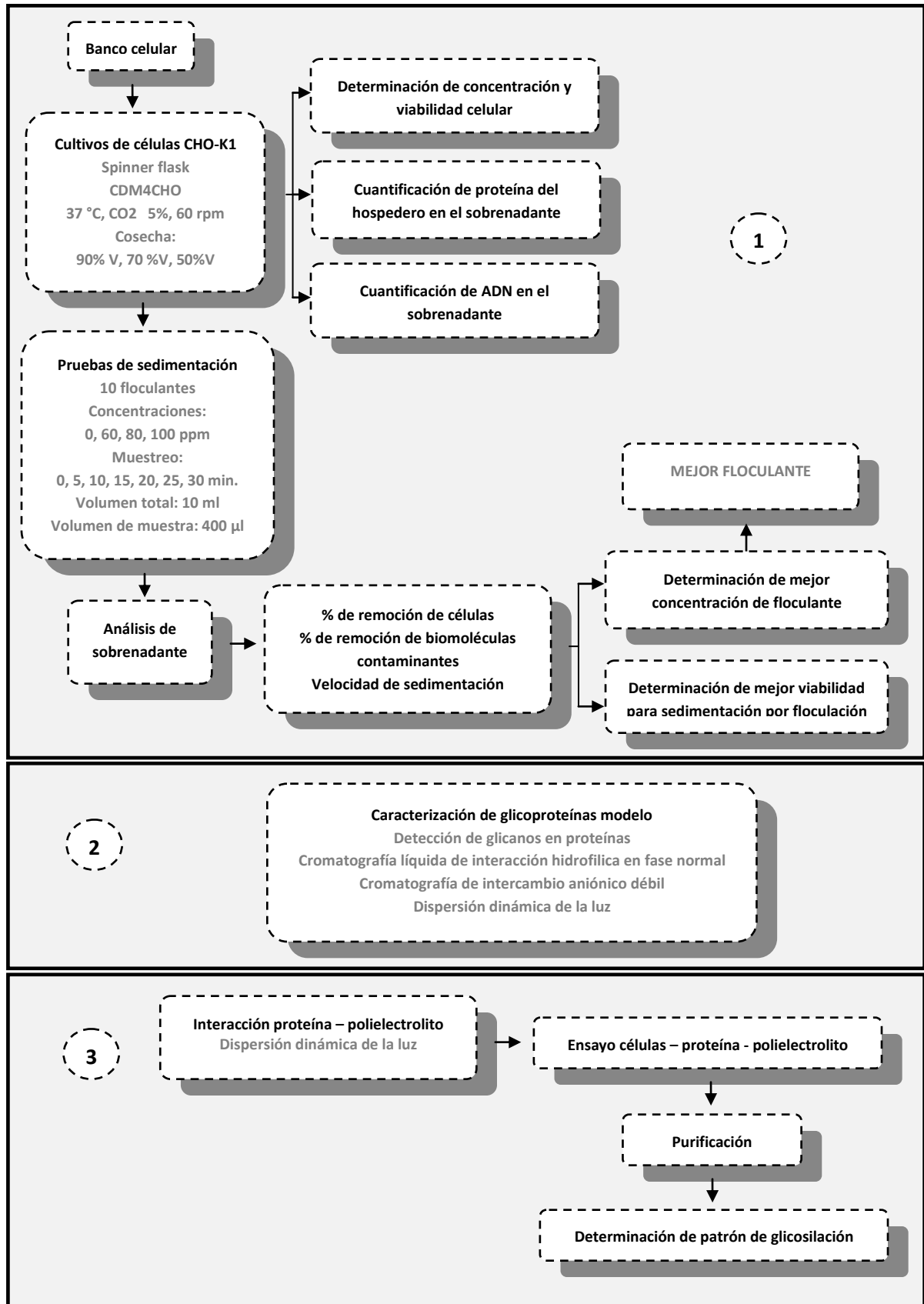


Figura 11. Estrategia experimental

Tabla 7. Polímeros utilizados.

Nombre	Peso molecular (kDa)	Compañía	pI	Referencia
Poli-L-Histidina	5 - 25	Sigma-Aldrich	7.6	Aunins & Wang, 1989
Polietilenimina	15 - 25	Sigma-Aldrich	11	Atkinson & Jack, 1973; Dissing & Mattiason, 1999; Cordes <i>et al.</i> , 1990
Poli-L-Arginina	25 - 40	Sigma-Aldrich	10.8	Aunins & Wang, 1989
Poli-L-Lisina DL	25 - 40	Sigma-Aldrich	9.8	Aunins & Wang, 1989
Poli-L-Ornitina	30 - 70	Sigma-Aldrich	8-9	Aunins & Wang, 1989
Poli-L-Lisina	30 - 70	Sigma-Aldrich	9.8	Aunins & Wang, 1989
Tetraborato de sodio	381.4 (g/mol)	Sigma-Aldrich	-	Bonnerjea <i>et al.</i> , 1988
Superfloc 90	Muy alto (relativo)	Servical de México	-	-
Kemira C-573	Bajo (relativo)	Kemira de México	-	-
Kemira C-581	Alto (relativo)	Kemira de México	-	-

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cultivos celulares

La línea celular CHO-K1 fue proporcionada amablemente por la empresa PROBIOMED. El medio de cultivo utilizado para esta línea celular fue CDM4CHO (HyClone, No Cat. SH3055601) el cual es químicamente definido y fue suplementado con 6 mM de L-glutamina (Sigma, G-3126), 2.1 g \cdot L⁻¹ de bicarbonato de sodio (JT Baker), 0.1 g \cdot L⁻¹ de Pluronic F-68 (Sigma, P-1300) y solución de estreptomicina (0.1 mg \cdot ml⁻¹) y penicilina (100 U \cdot ml⁻¹) (Sigma, A5955) a una concentración 1X. El medio de cultivo fue esterilizado por filtración a través de membranas de 0.22 μ m (Millipore Corp., MA) y conservado en refrigeración a 4°C por periodos no mayores a un mes.

Los inóculos para los cultivos experimentales partieron de células subcultivadas en frascos T de 75 cm² de área superficial con 10 ml de medio de cultivo (con un número de pases no mayor a 25) y mantenidas en incubadora de ambiente controlado a 37°C, con 5 % de concentración de CO₂. Las células se subcultivaron una vez alcanzada una concentración celular viable de 1 \cdot 10⁶ cel \cdot ml⁻¹ con la finalidad de mantenerlas siempre en crecimiento. A todos los inóculos se le siguió la cinética de crecimiento con la finalidad de utilizar células que estuvieran en la fase exponencial de crecimiento. Todos los experimentos se iniciaron con una viabilidad celular mayor del 90 % y a una concentración inicial de 2 \cdot 10⁵ células viables \cdot ml⁻¹, para evitar variaciones por el tamaño y condición del inóculo.

Los cultivos fueron establecidos en frascos agitados de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml, en una incubadora de atmósfera controlada a 95% de humedad, 5% CO₂, con una velocidad de agitación de 60 rpm y una temperatura de 37 °C.

6.2. Mantenimiento de células

6.2.1. Banco celular

Las células se centrifugaron y se resuspendieron utilizando como medio de congelación medio acondicionado (metabolizado) y medio fresco CDM4CHO en una relación 1:1, además se agregó 10% de DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA No. D2650) como crioprotector. La concentración celular final fue de $5 \text{ a } 10 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$ con una viabilidad superior al 90%. Se congelaron los crioviales a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h y finalmente fueron depositados en un tanque conteniendo nitrógeno líquido para preservar a $-170 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.2.2. Descongelamiento de células

Para la propagación del inóculo se descongeló un criovial del banco celular como es sugerido por Freshney (1983), descongelando de manera rápida a temperatura ambiente. La suspensión se depositó en un tubo Corning de 50 ml con 20 ml de medio fresco y se centrifugó a 500 rpm por 10 min. El sobrenadante se removió para eliminar el DMSO. Se resuspendió el botón celular en 15 ml de medio CDM4CHO y se sembró en cajas T de 75 cm^2 incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y se monitoreó su crecimiento y viabilidad cada 24 h.

6.3. Cinéticas de sedimentación

Los diferentes flocculantes fueron evaluados (Tabla 7) utilizando la misma concentración celular ($1.5 - 2 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$). El volumen de caldo de cultivo utilizado en estos ensayos fue de 10 ml, se muestreó cada 5 minutos retirando $400 \text{ } \mu\text{l}$ para análisis de concentración celular, concentración de proteína perteneciente al hospedero y concentración de ADN en el sobrenadante.

La metodología utilizada consistió en una adaptación del denominado “Test de jarras” (American Society for Testing and Materials, 1995). En este caso, 10 ml de caldo de cultivo fueron introducidos en un tubo para centrifuga con volumen de 15 ml, el polímero floculante se suministró al medio de cultivo y se dispersó por medio de fuerza mecánica (vórtex) de manera rápida (aproximadamente 10 segundos). Después de éste periodo se dejó sedimentar 30 minutos y cada 5 minutos se tomó una muestra de la superficie (sin remover el precipitado). La concentración de floculante propuesta para este tipo de ensayos fue alrededor de 60 a 100 ppm, correspondientes a 0.06 – 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de polímero floculante. Para cada ensayo el caldo provino del mismo spinner flask y el experimento de floculación se realizó por duplicado para cada floculante y manteniendo un control (10 ml de caldo sin adición de floculante).

Con los datos obtenidos se procedió a realizar gráficas de concentración celular contra tiempo y contra concentración de floculante, con lo cual se evaluó el porcentaje de remoción de células (Ec. 1), y por medio de un ajuste de decaimiento exponencial se calculó una constante de sedimentación (Ec. 2). También se determinó el porcentaje de remoción de biomoléculas contaminantes (ADN y proteína del hospedero) con base en la Ec. 1.

$$\text{Porcentaje de remoción de células} = \left(\frac{\text{No.de células iniciales} - \text{No.de células finales}}{\text{No.de células iniciales}} \right) * 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 1}$$

$$y = y_0 * e^{-K_s * t} \dots\dots\dots \text{Ec. 2}$$

Donde:

y = concentración celular en el tiempo t, células $\cdot \text{ml}^{-1}$.

y₀ = concentración celular en el tiempo 0, células $\cdot \text{ml}^{-1}$.

t = tiempo, min.

K_s = Constante de sedimentación, min^{-1} .

6.4. Análisis del sobrenadante

6.4.1. Concentración y viabilidad celular

La concentración celular se determinó utilizando un contador electrónico de partículas Coulter Counter Multisizer II (Coulter Electronics, Hialeah, FL), utilizando un tubo de apertura de 100 μm y aspirando para cada muestra un volumen de 500 μl . Para diluir las muestras y con la finalidad de no tener variaciones de tamaño debido a cambios en la osmolaridad, se utilizó una solución isotónica (Isotón II, Coulter, 7546719). El número de células dado por el equipo está expresado en células $\cdot 500 \mu\text{l}^{-1}$, para lo cual se multiplicaron los valores por dos para tenerlo en células $\cdot \text{ml}^{-1}$ y finalmente se multiplicó por la dilución realizada.

La viabilidad celular se determinó utilizando la técnica de exclusión (Freshney, 2005) por medio del colorante azul de tripano, el cual es un indicador de la integridad de la membrana citoplasmática. Mediante esta tinción, las células muertas son permeables al colorante y se tiñen de azul, mientras que las vivas permanecen refringentes. La cuantificación se realizó en un hemacitómetro con azul de tripano (Sigma T-8154) al 20 % en PBS pH 7.5 y con un microscopio óptico (Fisher Micromaster), utilizando el objetivo y ocular de 10X.

6.4.2. Cuantificación de proteína del hospedero

La cuantificación de proteína en el sobrenadante se llevó a cabo por el método de Bradford (1976) el cual tiene como principio la unión del reactivo Coomassie G-250 a la proteína; la cantidad de proteína puede ser estimada determinando la cantidad de tinte en la forma iónica color azul, este cambio en la coloración es cuantificable midiendo absorbancia y proporcional a la cantidad de proteína. Este ensayo se realizó en placas de 96 pozos (Costar®3590 Corning, NY), cada pozo conteniendo 150 μl de muestra y 50 μl del reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad No. Cat. 500-0001).

La muestra se diluyó (1, 1:10, 1:100) de modo que la lectura de absorbancia se encontrara en el intervalo de la curva de calibración. El máximo de absorbancia se encuentra en 595 nm cuando el colorante se une a la proteína. El ensayo se realizó por triplicado y se midió en un lector de placas ELx800 marca Bio Teck (Bio Teck Instruments Inc. World Headquarters, Winooski, USA).

Para la curva de calibración, se realizaron soluciones de 0, 10, 20, 40, 60 y 80 del $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de albúmina sérica bovina (BSA) a partir de un estándar de $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, diluido en agua MilliQ filtrada por una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore, CA).

6.4.3. Cuantificación de ADN

La concentración de ADN se determinó mediante el uso del colorante fluorescente PicoGreen (PicoGreen®, Molecular Probes No. Cat. 11496), el cual se intercala en el ADN de doble cadena y la respuesta que se obtiene es el cambio en la lectura de la fluorescencia por medio de un fluorímetro. Las muestras fueron excitadas a 480 nm y la intensidad de emisión de fluorescencia se midió a 520 nm. Esta técnica ofrece la ventaja de consumir bajas cantidades de muestra (6 – 20 μl), además de ser altamente sensible (desde $1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) y específica al ADN de doble cadena.

Se emplearon reactivos concentrados para este ensayo (componente A: colorante PicoGreen 200X y componente B: Buffer TE (Tris-EDTA) 20X) que se diluyeron a una concentración de trabajo 1X con H_2O libre de nucleasas (Sigma, No. Cat. W4502).

La muestra final estuvo compuesta por una mezcla PicoGreen – muestra problema en relación 1:1, en un volumen final de 10 μl . La muestra problema en algunos casos fue diluida en buffer TE (concentraciones muy altas de ADN). Se tomó como blanco la fluorescencia emitida por una solución de buffer TE y PicoGreen en concentración 1X. Todas las muestras fueron mezcladas en un vórtex y equilibradas por 5 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron leídas por triplicado en un fluorímetro Nandrop ND-3300 (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 480 nm de excitación y 520 nm de emisión.

En este trabajo reportamos el porcentaje de remoción de ADN debido a la acción de los polielectrolitos, este valor fue calculado por medio de la Ec. 3.

$$\text{Porcentaje de remoción de DNA} = \left(\frac{\text{RFU inicial} - \text{RFU final}}{\text{RFU inicial}} \right) * 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 3}$$

Donde:

URF inicial = fluorescencia correspondiente a ADN previo a la adición de floculante, URF.

URF final = fluorescencia correspondiente a ADN después de la adición de floculante, URF.

URF: Unidades relativas de fluorescencia. La fluorescencia depende proporcionalmente de la cantidad de colorante unido al ADN de doble cadena.

Una relación de URF a concentración de ADN en el sobrenadante puede calcularse mediante la Ec. 4, la cual fue obtenida mediante la realización de una curva estándar, lineal para el intervalo de 1 a 1000 ng · ml⁻¹ de ADN. El ADN cuantificado se encuentra incluido en el kit (PicoGreen®, Molecular Probes No. Cat. 11496).

$$URF = 8.76 \cdot ADN \text{ (ng} \cdot \text{ml}^{-1}\text{)} \dots\dots\dots \text{Ec. 4}$$

6.4.4. Cuantificación de proteína recombinante

La concentración de AcMo se determinó mediante un ensayo de ELISA tipo directo. En placas de 96 pozos (Costar®3590 Corning, NY) se colocó la muestra de anticuerpo diluida en PBS (0.14 mol · l⁻¹ NaCl, 0.003 mol · l⁻¹ KCl, 0.0015 mol · l⁻¹ KH₂PO₄ y 0.008 mol · l⁻¹ K₂HPO₄ en agua pura) pH 7.2 y se dejó incubando de 16 a 18 h a 4°C para que el anticuerpo se adhiriera a la superficie del pozo. Se lavó cada pozo dos veces con 150 µl de PBS-Tween 20 al 0.05 % (v/v); en este y en pasos subsiguientes de lavado. Se colocaron en cada pozo 125 µl de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, A-7638), a una concentración de 10 mg · ml⁻¹ en PBS y se dejó incubando por 2 h a temperatura ambiente para bloquear la superficie activa remanente. Para la detección se utilizó un conjugado peroxidasa - anti IgG humano producido en cabra (Sigma, St. Louis, MO, USA No. A8667), el cual reconoce a la molécula completa a una dilución de 1:2,500. El revelado se llevó a cabo con 0.4 mg · l⁻¹ de o-fenilendiamina (OPD) (Sigma, St. Louis, MO, USA No. P9029) en buffer 0.1 M de fosfato dibásico de sodio pH 5 con 10 µl de peróxido de hidrógeno; la reacción se detuvo después de 10 min con 50 µL de H₂SO₄ 1N. La curva de calibración se realizó con una IgG humana estándar (Sigma, St. Louis, MO, USA No. I4506) en un intervalo lineal entre los 5 y 800 ng · ml⁻¹. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 490 nm, en un lector de placas ELx800 marca Bio Teck (Bio Teck Instruments Inc. World Headquarters, Winooski, USA).

6.5. Purificación de AcMo

Al finalizar el experimento de floculación, se recolectó el medio de cultivo con células remanentes y se centrifugó a 4,000 rpm por 15 min en una centrifuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, AG) para separar las células que el floculante no fue capaz de sedimentar. El sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.22 μm (Millipore Corp., MA) para eliminar sólidos suspendidos. Posteriormente, el filtrado se concentró a un volumen de 10 ml en una celda de diafiltración Amicon® (Millipore Corp., MA) usando una membrana de celulosa regenerada con un corte molecular de 100 kDa y se equilibró con 4 ml de buffer de unión (fosfato de sodio dibásico 20 mM pH 7). Finalmente, la solución conteniendo el AcMo fue purificada utilizando un equipo de cromatografía de baja presión ÄKTA *prime* (GE Healthcare, UK) por cromatografía de afinidad con una columna de sefarosa-proteína A: HiTrap Protein A HP de 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech). De acuerdo a los protocolos de purificación de AcMo reportados para análisis de glicanos (Kunkel *et al.*, 1998), se utilizó como buffer de unión de fosfato de sodio como arriba es descrito, como buffer de elusión glicina-HCl 0.1 M pH 2.7 y buffer de neutralización Tris-HCl 1 M pH 9 (todos de Sigma). Para desalar el AcMo purificado se utilizaron unidades de filtración Centricon® de 2mL de capacidad con un corte molecular de 10 kDa. La pureza del AcMo fue analizada por SDS-PAGE al 10 %.

6.5.1. Cuantificación de la concentración de AcMo purificado

La concentración del AcMo purificado fue determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando el NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), utilizando un coeficiente de extinción molar de 14, dado por el programa del equipo para un IgG y confirmada por ELISA directo.

6.6. Detección de glicanos

La presencia de oligosacáridos en las proteínas modelo fue identificada por medio de un kit de detección de glicanos (Roche, No. Cat. 11142372001), el cual tiene como principio la oxidación de los grupos hidroxilo contenidos en los azúcares con un tratamiento de metaperiodato, en el cual se generan grupos aldehídos susceptibles a la unión covalente de digoxigenina por medio de un grupo hidrazida, una vez formado el complejo glicoconjugado - digoxigenina éste puede ser detectado en un ensayo inmunoenzimático por medio de un anticuerpo anti-digoxigenina

acoplado a alcalino fosfatasa. La sensibilidad de éste método se encuentra alrededor de 20 ng (reportada para fetuína).

Este ensayo se realizó mediante geles de SDS-PAGE (Winkler *et al.*, 2007) al 10% (duplicados) cargados con 5-10 µg de proteína para cada muestra y corridos a 100 volts constantes por 1.5 h. Un gel fue teñido con Azul de Coomassie (Brillant blue R-250, Sigma) para detectar la presencia y pureza de la proteína, el otro gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond™-C Extra, UK. No. Cat. RPN303E) por 2 h a 400 volts en una cámara de transferencia semi-húmeda para posteriormente detectar proteína glicosilada por Western-Blot con el kit. Con la proteína transferida en membrana ésta se lavó con PBS (50 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl) pH 6.5 (2 veces, por 10 min después de cada incubación) para posteriormente llevar a cabo la oxidación de la proteína con 10 mM de metaperiodato de sodio en buffer de acetato (100 mM CH₃COONa) pH 5.5 por 20 min a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con PBS y se incubó con 1 µl de DIG-0-3-succinil-ε-ácido aminocaproico hidrazida disuelto en 5 ml de buffer de acetato pH 5.5 durante 1 h a temperatura ambiente. Se empleó TBS (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl) pH 7.5 para lavado en los pasos subsecuentes dado que en pasos previos el Tris podría haber interferido en la unión de la digoxigenina con los aldehídos. En este paso la membrana puede ser teñida con una solución de rojo de Ponceau S (incluida en el kit) para corroborar la transferencia de la proteína, en caso contrario se bloquean los sitios activos remanentes de la membrana con una solución de BSA a una concentración de 10 mg • ml⁻¹ en TBS por 30 min. La detección se llevó a cabo con 10 µl de una solución de anti-digoxigenina-AP disueltos en 10 ml de TBS por 1 h. Finalmente el revelado se realizó con 200 µl de una solución de NBT/BCIP (4-Nitro cloruro de tetrazolina azul / 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) disuelta en 10 ml de Tris-Buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M NaCl) pH 9.5.

6.6.1. Asialoeritropoyetina

La asialoeritropoyetina (aEPO) es producida generalmente por un tratamiento enzimático a la eritropoyetina con una sialidasa (neuroaminidasa), en este estudio esta molécula fue producida mediante un tratamiento químico (Higuchi, 2009) para evitar una operación de purificación de la aEPO. La metodología utilizada consiste en la acidificación con calentamiento de la solución que contiene a la proteína a pH 4 o menor. Posteriormente, la solución se enfrió y el pH se neutralizó. La EPO puede contener de 1 a 14 ácidos siálicos (12 por N-glicosilaciones y 2 por O-glicosilación); esta técnica asegura la completa remoción de estos carbohidratos.

Específicamente, a 190 μl de una solución de EPO ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) se le añadió 10 μl de HCL 1 N y se calentó a 80 °C durante 1 h. Posteriormente se agregaron 2 μl de una solución neutralizante (NaOH 5 N), la solución fue enfriada a temperatura ambiente, el pH final fue 7. La ausencia de ácido siálico fue comprobada en geles de SDS-PAGE y Western-Blot con el kit de detección de glicanos (Roche, No. Cat. 11142372001) por medio de una variación al método descrito anteriormente, la cual consiste en la oxidación específica de oligosacáridos que contienen ácido siálico por medio de una solución 1 mM de metaperiodato de sodio a una temperatura de 0 °C durante 20 min. Esto provoca la formación de grupos aldehído susceptibles al ataque de digoxigenina exclusivamente en ácidos siálicos (O'Shannessy et al., 1987; Burnette, 1981). También se evaluó el diámetro hidrodinámico de la aEPO por medio de dispersión dinámica de luz, para esto la proteína fue diluida en buffer de fosfatos 0.05 M, pH 6.8 a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

6.7. Interacción proteína – polielectrolito

Entre las técnicas experimentales aplicables para el estudio de la interacción proteína – polielectrolito destaca la dispersión dinámica de la luz dada su facilidad de uso y el hecho de que es un método no invasivo y por lo cual se puede recuperar la muestra para análisis posteriores (Cooper *et al.*, 2005).

Se procedió a determinar el tamaño de las proteínas recombinantes modelo utilizadas en éste trabajo así como del polielectrolito polietilenimina con el fin de establecer su posible interacción inferida como un aumento de diámetro hidrodinámico (DH) de las poblaciones analizadas. El ensayo se realizó en un equipo ZetasizerNano (Malvern) en una celdilla de cuarzo con un volumen de 50 μl . Las muestras fueron filtradas por 0.22 μm para evitar lecturas erróneas debido a polvo, dada la alta sensibilidad del equipo. Las proteínas se ensayaron puras y en buffer de fosfatos 0.05 M pH 6.8, al igual que la polietilenimina. Las lecturas se llevaron a cabo por triplicado y como resultado se obtuvo una gráfica que muestra el porcentaje de volumen de poblaciones de moléculas en relación al total que dispersa la luz.

6.8. Identificación de poblaciones y estructuras de glicanos

6.8.1. Análisis de glicanos por HPLC de fase normal

Se determinó el patrón de N-glicosilación del AcMo omalizumab y de EPO mediante la técnica de HPLC - Fase Normal descrita por Guile *et al.* (1997) y Palomares *et al.* (2003), la cual se resume a continuación:

Se procesaron 100 µg de proteína llevándolos a un volumen de 32.5 µl secando la muestra en un evaporador centrífugo SpeedVac Plus SC110 A SAVANT (Thermo Scientific, Waltham, MA) y adicionando agua MilliQ filtrada por 0.22 µm. La proteína se desnaturalizó para facilitar el libre acceso de la enzima que libera los glicanos de la cadena polipeptídica con una solución de 2% SDS, 1M 2-β-mercaptoetanol y hervida por 5 min a 99 °C. Posteriormente se adicionó IGEPAL 630 al 7 %, buffer para PNGasa-F y agua MilliQ. Se llevó a cabo la desglicosilación enzimática de la proteína mediante la digestión con 1 unidad de PNGasa-F (N-Glicosidasa-F 1U • µl⁻¹ de *Elizabethkingia meningosepticum*, Calbiochem Cat. No. 362185) e incubando por 18 h a 37 °C. La PNGasa-F libera todos los tipos de N-oligosacáridos (complejos, híbridos y altos en manosa). Se adicionó 100 pmol de maltosa (Sigma, M9171) a cada muestra como control interno y se procedió a eliminar la proteína de los glicanos liberados, precipitándola con etanol absoluto a -20 °C y centrifugando 2 min a 1,000 rpm, se recuperó el sobrenadante el cual contiene los glicanos y se llevó a sequedad. Los glicanos libres de proteína se derivatizaron en su extremo amino reductor con el colorante fluorescente 2-aminobenzimida (2-AB Prozyme GKK-404, San Leandro CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se lavó el exceso de colorante con agua MilliQ filtrada por 0.22 µm, ácido acético al 30% (JT-BAKER 0129-01) y acetonitrilo 100 % (Burdick & Jackson, No. Cat. CE097, NJ) en un papel filtro Whatman No. 1 (GE Healthcare, UK) previamente tratado. Los glicanos se eluyeron con agua ultrapura y posteriormente se concentraron en un volumen de 100 µl (1 µg • µl⁻¹ de proteína original), y se almacenaron a -20 °C.

Se procedió a la identificación, cuantificación y análisis de glicanos derivatizados. La muestra de glicanos-2AB se inyectó al cromatógrafo en una alta concentración de solvente orgánico (80% acetonitrilo – 20% formato de amonio) donde se adsorbieron a la superficie de la columna y fueron posteriormente eluidos bajo un gradiente acuoso. De esta forma los glicanos fueron removidos de la columna y por tanto separados con base a su hidrofiliidad; los glicanos más pequeños con menos grupos hidroxilo (menos hidrofílicos) eluyeron a bajas concentraciones de solvente acuoso y por tanto antes que los glicanos más grandes (más hidrofílicos). De acuerdo a

lo anterior, los glicanos se analizaron mediante un sistema HPLC (controlador 600S, bombas 626, degasificador en línea AF, autoinyector 717plus marca WATERS y software Empower (Milford, MA)). La corrida cromatográfica se realizó en fase normal utilizando una columna amido (TSKgel Amide-80 TOSOH Bioscience), con un gradiente de acetonitrilo y formato de amonio 250 mM pH 4.4 en corridas de 180 min a 30 °C. Se utilizó un detector de fluorescencia 2475 de Waters a una longitud de onda de 330 nm de excitación y de 420 nm de emisión, óptimas del 2-AB. En una corrida se inyectó el volumen de glicanos correspondiente a 10 µg de proteína. En el análisis de los datos de la corrida cromatográfica se determinó el tiempo de retención, el área y % de área de cada pico con respecto al área total de glicanos del cromatograma. Con los resultados obtenidos se pudo llevar a cabo un análisis de la microheterogeneidad (caracterización de todas las estructuras de N-glicanos en la proteína). Se procedió a la caracterización estructural de los picos obtenidos (microheterogeneidad). Los glicanos se identificaron según su migración en unidades de glucosa (UG) de acuerdo a la comparación de sus tiempos de retención con los de un homopolímero estándar de dextrana (escalera de glucosa-2AB, Sigma, D3818), el tiempo de retención de cada polímero de glucosa se graficó contra su valor de unidades de glucosa y mediante una regresión polinomial de cuarto orden se obtuvo la ecuación para convertir los tiempos de retención de los picos identificados a UG (Figura 12).

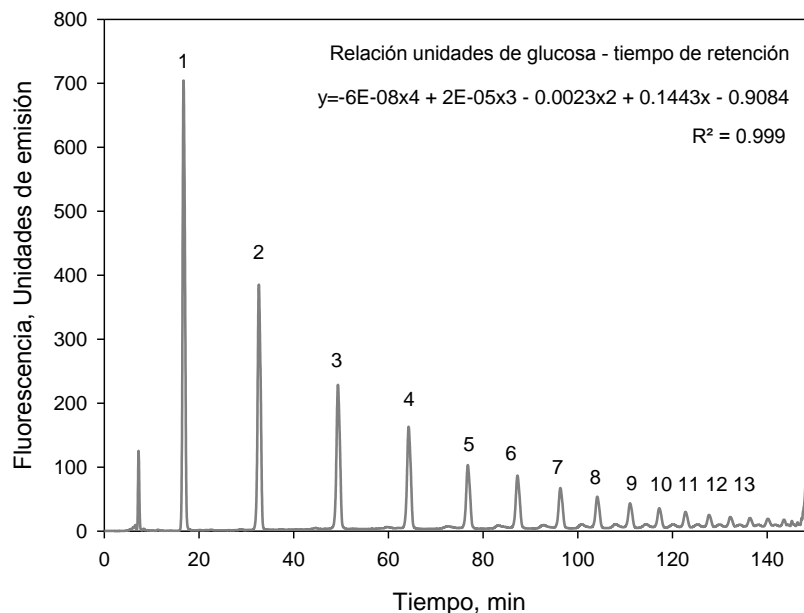


Figura 12. Curva de calibración tiempo de retención – unidades de glucosa.

Modificado de: Royle, 2006.

6.8.2. Tratamiento con exoglicosidasas

Una vez obtenido el cromatograma se pueden proponer estructuras de glicanos conforme a sus tiempos de retención y lo reportado en bases de datos de estructuras publicadas en la literatura bajo las mismas condiciones cromatográficas (GlycoBase 2.0: Dubin-Oxford Glycobiology Lab. 2AB database). El siguiente paso consistió en someter a la muestra (lo correspondiente en glicanos de 10 μg de proteína) a digestiones independientes con enzimas exoglicosidasas específicas: β (1-3,4)-Galactosidasa (GKX-5013 Glyko® Prozyme), α -(1-2,3,4,6)-Fucosidasa (X-5006 Glyko® Prozyme), β -N-Acetilhexosaminidasa (X-5003 Glyko® Prozyme), Sialidasa I (X-5021 Glyko® Prozyme) y α -Manosidasa (X-5010 Glyko® Prozyme) bajo las condiciones y buffers recomendados por el proveedor. Dichas enzimas actúan como se esquematiza en la Figura 13. La incubación se realizó durante 18 h a 37 °C, después se retiró la enzima de la muestra (con precipitación por etanol a -20 °C y centrifugación) y se analizaron en el HPLC, por el método descrito anteriormente. Los glicanos susceptibles a la acción de las exoglicosidasas experimentarán un cambio en su tiempo de retención con respecto al determinado para la muestra sin tratamiento. Mediante este procedimiento es posible entonces corroborar las estructuras de glicanos propuestas en los pasos previos.

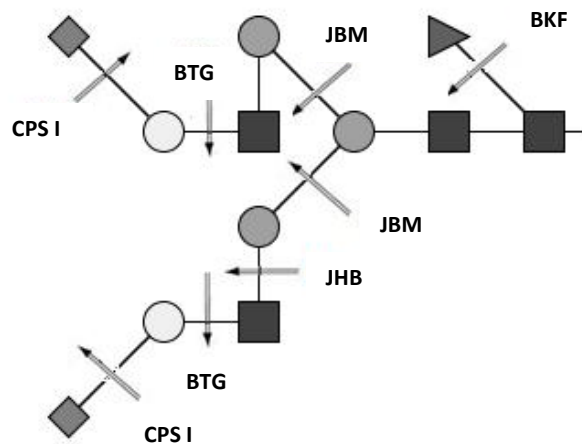
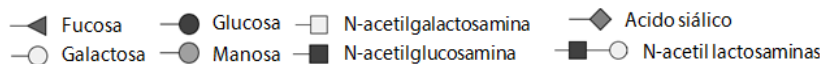


Figura 13. Acción de exoglicosidasas.



CPS I: *Clostridium perfringens* Sialidasa I

BTG: Bovine testes β -galactosidasa

JHB: Jack bean β -n-acetilhexosaminidasa

JBM: Jack bean α -manosidasa

BKF: Bovine kidney α -fucosidasa

6.8.3. Nomenclatura de glicanos

Para los glicanos complejos (sin manosa terminal) se utilizó la nomenclatura tipo Oxford (Dubin-Oxford Glycobiology Lab).

A#: se refiere al número de antenas. Cuando se utiliza esta nomenclatura **A** incluye al núcleo quitobiosa (2 unidades de N-acetilglucosamina con enlace β -1,4), las manosas y las N-acetilglucosaminas correspondientes).

F ó B: se agregan después de **A#** si el núcleo del azúcar contiene fucosa (**F**) y/o esta bisectado con N-acetilglucosamina (**B**).

G#: indica el número de galactosas.

F (después de G): indica galactosa fucosilada.

Lac#: Indica el número de lactosaminas (N-acetilglucosamina – galactosa).

S#: Indica el número de ácidos siálicos.

Para los azúcares altos en manosa sólo se indica el número de manosas, sin incluir el núcleo de N-Acetilglucosaminas. En los azúcares tipo híbridos y paucimansa (3 ó menos manosas) se nombra la estructura completa, empezando por el extremo reductor y utilizando las abreviaturas **N** para N-acetilglucosamina, **F** para fucosa y **M** para manosa.

6.8.4. Análisis de glicanos por cromatografía de intercambio aniónico débil en HPLC

Se determinaron las poblaciones de carbohidratos pertenecientes a Xolair y eritropoyetina con base en su carga. Este ensayo se realizó como es descrito por Guile *et al.* (1997). Los glicanos derivatizados con el colorante, como se detalló anteriormente, fueron analizados mediante el mismo sistema cromatográfico. Las poblaciones de oligosacáridos marcados con 2-AB fueron separadas en una columna de DEAE (TSK-gel, 7.5 mmx7.5 cm, Tosoh Bioscience Inc.). El gradiente utilizado fue: solvente A, formato de amonio pH 9; solvente B, H₂O mQ. La velocidad de flujo fue de 1 ml • min⁻¹. El gradiente inicial fue de 0-5% de A por 12 min, 5-21% de A por los siguientes 13 min, después 21-80% de A por 25 min y finalmente 80-100% de A por 5 min, posteriormente la columna es equilibrada con 100% de B por 5 min. Las muestras fueron diluidas en H₂O mQ para su inyección en el cromatógrafo. La corrida tiene una duración total de 80 min. Bajo estas condiciones los carbohidratos se pueden separar con base en su carga en 5

categorías: neutros (S0), mono- (S1), bi- (S2), tri- (S3), y tetra- (S4) sialidades; distintivos por sus tiempos de retención (Figura 14).

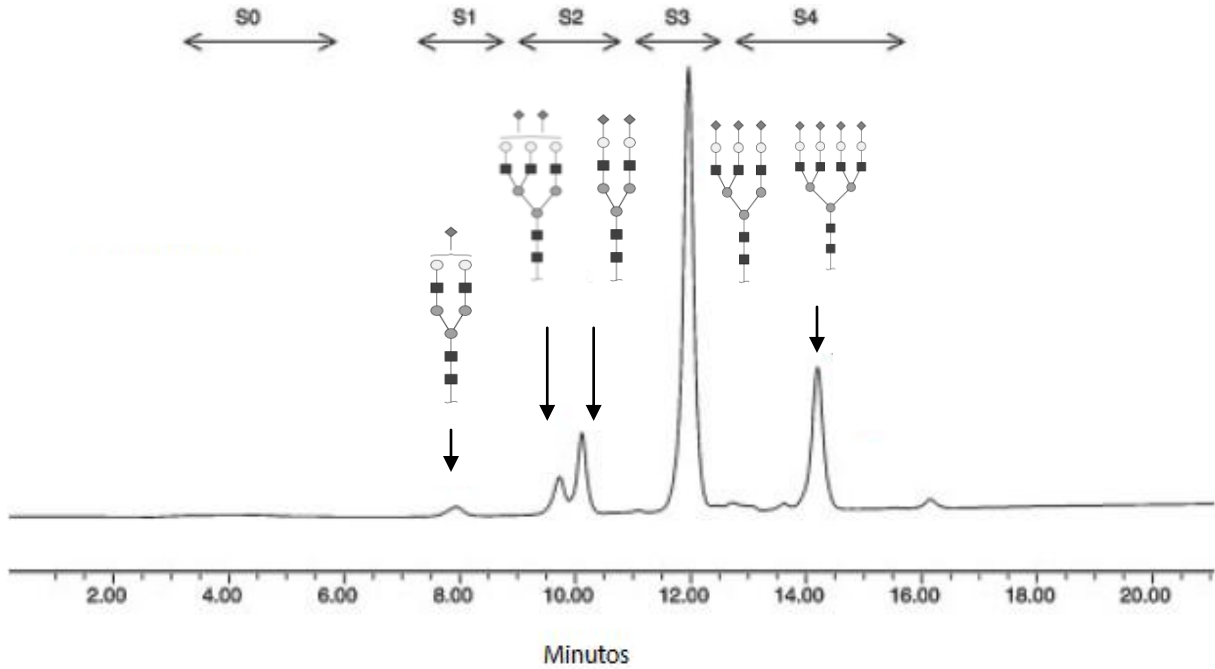


Figura 14. Cromatografía WAX-HPLC.

◄ Fucosa ● Glucosa ◆ Acido siálico ◻ Galactosa ● Manosa ◻ N-acetilglucosamina

S0: población de glicanos neutros, **S#:** indica el número de ácidos siálicos presentes en la población de oligosacáridos.

Modificado de: Restelli *et al.*, 2006.

6.9. Análisis estadístico

La probabilidad de diferencia entre los resultados obtenidos en los ensayos de sedimentación celular y dispersión dinámica de luz fue establecida mediante una prueba de diferencia de medias. El nivel de significancia utilizado fue de 0.05 lo cual corresponde a una posibilidad de 5 en 100 de rechazar la hipótesis. El cálculo de la razón t fue llevado a cabo por medio de la Ec. 5 y fue comparado con los valores establecidos en la tabla de distribución t para los grados de libertad y probabilidad determinada, sí la razón t calculada es mayor al valor establecido en la distribución, entonces la diferencia entre medias es significativa.

$$t = \frac{\widehat{X}_1 - \widehat{X}_2}{S} \dots\dots\dots \text{Ec. 5}$$

Donde:

$$S = \sqrt{\left(\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{n_1 + n_2 - 2}\right) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}$$

t = Razón t

X_n = Media de la población

n_n = Tamaño de la muestra

S = error estándar de la diferencia de dos medias

$$gdl = n_1 + n_2 - 2$$

gdl = grados de libertad

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización de la línea celular

La Figura 15 resume el comportamiento cinético en cuanto a crecimiento, viabilidad, concentración de proteína del hospedero (PCH) y ADN de la línea celular CHO-K1 durante 12 días de cultivo, tiempo en el cual la viabilidad decayó alrededor del 50%. Aunque en la industria el cultivo es detenido cuando se alcanza la máxima productividad, en este estudio se mantuvo hasta esta situación a manera de modelo y con el fin de establecer el efecto de la viabilidad sobre la sedimentación de células de mamífero por la acción de agente floculantes poliméricos.

La velocidad específica de crecimiento se calculó graficando el logaritmo de la concentración de células viables durante la fase exponencial en función del tiempo, utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} \dots\dots\dots \text{Ec. 3}$$

El resultado de tal procedimiento presentó una velocidad de crecimiento de $0.021 \pm 0.9 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, se alcanzaron densidades celulares entre 1.6 y $1.8 \cdot 10^6$ células $\cdot \text{ml}^{-1}$. A las 120 h la viabilidad comenzó a decrecer (<90%), mientras que para las 240 h y 288 h la viabilidad fue de 70 y 50%. En estas tres condiciones de viabilidad se efectuaron los ensayos de floculación con polímero, teniendo pH de 7.31 ± 0.05 , 7.12 ± 0.07 y 6.92 ± 0.04 respectivamente. En cuanto a las biomoléculas contaminantes presentes en el medio de cultivo, su concentración aumentó rápidamente a medida que decayó la viabilidad, lo cual denota lisis celular. La proteína del hospedero fue alrededor de $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a 90 % de viabilidad, mientras que en las etapas finales del cultivo alcanzó hasta $300 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Por otra parte, el ADN en el sobrenadante se encontró entre los 2,500 y 10,000 URF en los tiempos establecidos. De manera general, la velocidad de crecimiento, concentración celular y concentración de proteína del hospedero concordaron con lo reportado en la literatura para esta línea celular (Butler & Jenkins, 1989)

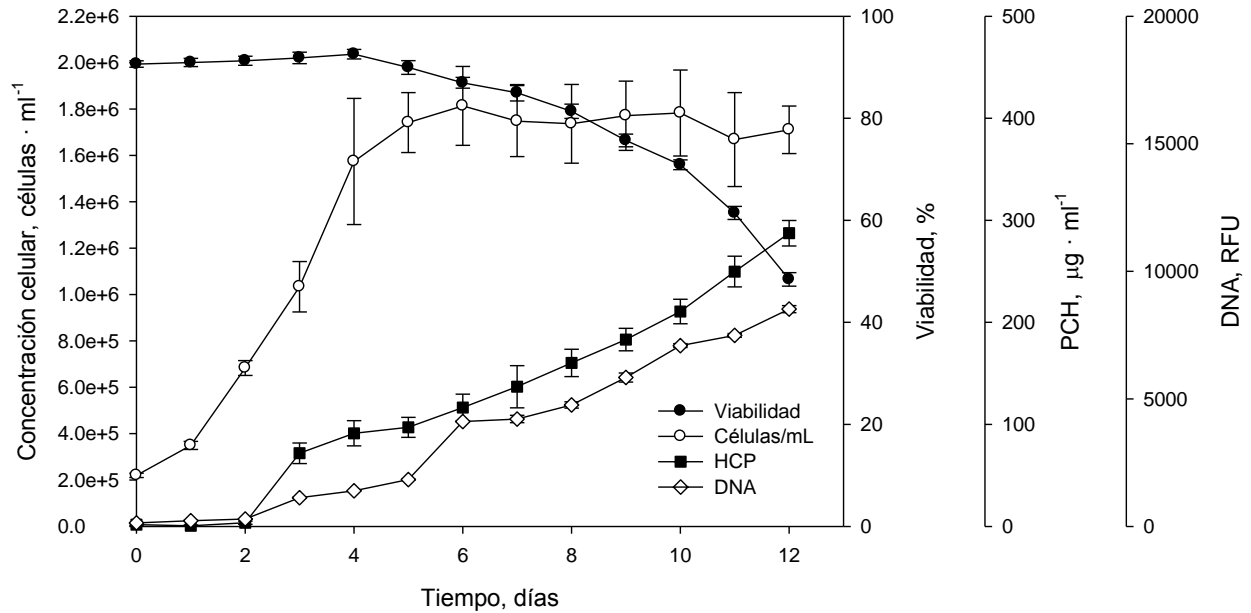


Figura 15. Cinética de crecimiento de la línea celular CHO-K1.

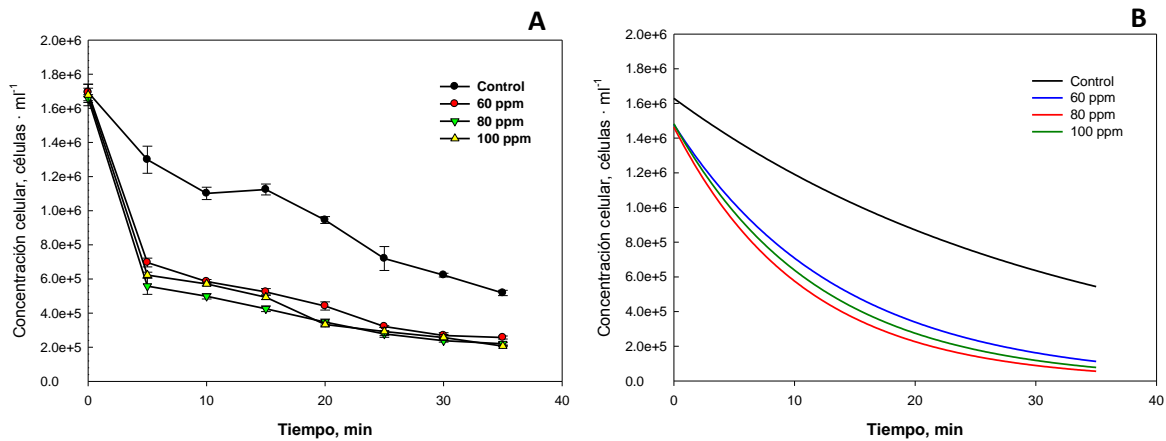
Se muestra el perfil de crecimiento, viabilidad y concentración de proteína y ADN en el sobrenadante. Las barras error representan la desviación estándar de tres experimentos.

7.2. Cinéticas de sedimentación

Diversos estudios han demostrado la capacidad de diferentes polímeros como óxido de polietileno (PEO), poliácridamida (PAA), ácido poliacrílico (PAC), polietilenimina (PEI) y quitosan entre otros, para flocular diferentes microorganismos (*E. coli* y *B. thuringiensis*), demostrando una alta remoción de sólidos en este tipo de suspensiones (Barany & Szepesszentgyfgyi, 2004). Salt y colaboradores (1995) también han utilizado esta operación para la remoción de levaduras y bacterias (*S. cerevisiae* y *E. coli*) empleando PEI y logrando reducir los niveles de turbidez hasta un 95%. En cuanto al uso de polímeros para flocular células de mamífero, Aunins & Wang (1989) emplearon poli-L-lisina, poli-L-histidina, poli-L-arginina entre otros agentes floculantes para constatar que sí era posible la aglomeración de células CHO, HeLa e hibridomas debido a la neutralización de sus cargas negativas en la superficie celular con estos polímeros. En este trabajo se utilizaron algunos de los polímeros reportados en la literatura así como polímeros de alto peso molecular de venta comercial utilizados en el tratamiento de agua.

La Figura 16 muestra una cinética de sedimentación de células CHO en donde fue utilizado un polímero para mejorar la sedimentación. De manera general, se observó el mismo comportamiento cinético para la mayoría de los floculantes utilizados a excepción del tetraborato de sodio, el cual no presentó diferencias significativas con respecto a la muestra control. Las cinéticas de sedimentación de los diez floculantes, en las tres condiciones de viabilidad empleadas en este estudio se encuentran contenidas en el Apéndice A. El control consistió en 10 ml de cultivo que fueron tratados de la misma forma que a los que se les añadió floculante pero sin la adición de floculante. En el tiempo que duró el experimento (35 min) existió una disminución en la concentración celular de alrededor del 67% en el control, mientras que los medios de cultivo que fueron tratados con polímero como PEI, poli-L-histidina, poli-L-arginina y poli-L-lisina DL presentaron una remoción celular superior al 92% cuando la viabilidad celular fue del 90%. La Figura 17 muestra un resumen de los porcentajes de remoción y constantes de sedimentación calculados a partir de las cinéticas de sedimentación contenidas en el Apéndice A.

Figura 16. Cinética de sedimentación y cálculo de K_s .



A. Cinética de sedimentación de células CHO utilizando un polielectrolito

B. Cálculo de constantes de sedimentación

Se muestra un perfil de sedimentación de células CHO en el cual se ha empleado un polielectrolito para mejorar la sedimentación. El control indica que no fue adicionado floculante. Las barras de error representan la desviación media de experimentos realizados por duplicado. En **B.** las curvas de decaimiento representan el mejor ajuste de la Ec. 2 a los datos experimentales.

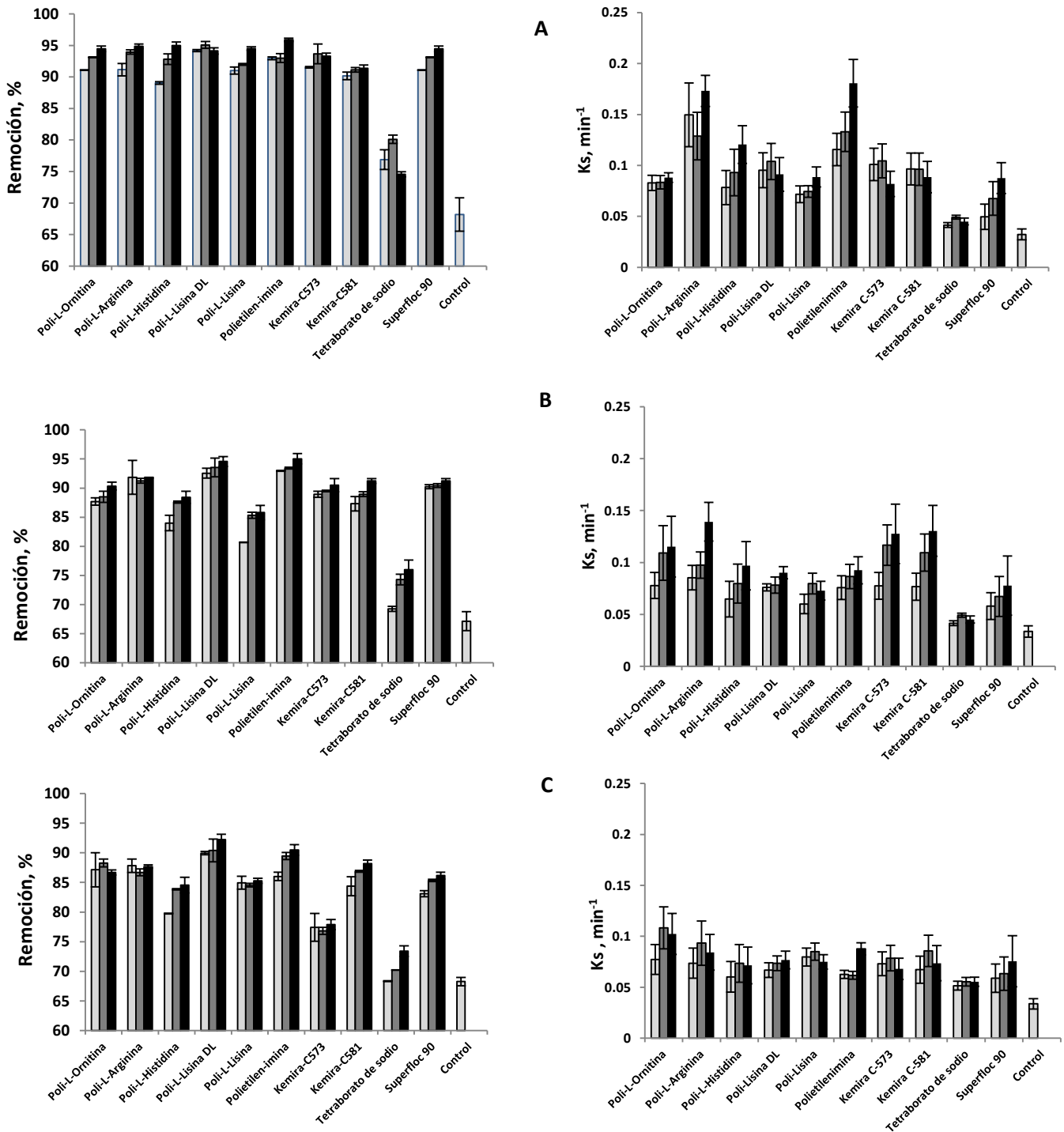


Figura 17. Resumen de parámetros de floculación para todos los floculantes.

Se muestran el porcentaje de remoción y las constantes de sedimentación de células CHO-K1 sedimentadas por la adición de floculante, las cuantificaciones se llevaron a cabo a partir de cultivos con diferente viabilidad, **A:** 90%, **B:** 70% y **C:** 50%, con tres condiciones de concentración de floculante, □ 60 ppm, ■ 80 ppm y ■ 100 ppm. El control indica que no fue adicionado floculante. Las barras de error representan la desviación media de experimentos realizados por duplicado.

Los experimentos anteriores fueron realizados por duplicado a diferentes viabilidades (90% correspondiente a 96 horas de cultivo, 70% a 216 horas y 50% a 264 horas) a manera de elucidar el efecto del estado de cultivo sobre la floculación.

En las gráficas se observa claramente el efecto del uso de polímeros sobre la remoción con respecto al control, dado que al tiempo final (35 min) se ha removido una cantidad superior al 90% del contenido celular para la mayoría de los polímeros (a excepción del tetraborato de sodio <80%) en la condición de viabilidad de 90%, mientras que el control en ese tiempo muestra una remoción alrededor del 68%. Esta tendencia se repitió a las diferentes viabilidades aunque la capacidad de remoción es afectada. Se propone que esta disminución es debido a la pérdida de integridad de la membrana, lo cual provoca una disminución en la carga de la superficie, además de la pérdida de ácidos siálicos presentes en ella debido a la acción de glicosidasas presentes en el medio de cultivo. Lee y colaboradores (1998) evaluaron la eficiencia de floculación de sulfato de aluminio y el polímero Pestan sobre una microalga (*Botryococcus braunii*) en diferentes etapas de crecimiento, con lo cual determinaron que la eficiencia de floculación es mayor en la etapa donde la microalga ha cesado su crecimiento. Por lo tanto, se estableció que la mejor condición de remoción celular para nuestro sistema fue al 90% de viabilidad, y que en este punto, el polímero que presentó la mayor capacidad de remoción de contenido celular fue PEI, seguido de la poli-L-histidina y poli-L-arginina. Estos últimos fueron reportados por Aunins & Wang (1989) y Peram *et al.* (2010) como los mejores agentes floculantes para células de mamífero en sus estudios. Cabe destacar, que en este caso el cálculo de una constante de sedimentación (K_s) permitió tener un valor de qué tan rápido se lleva a cabo la sedimentación por la acción de los polímeros. Se observa en la Figura 17 un decremento de la constante de sedimentación debido al decremento de la viabilidad. También se puede observar que el polímero con mayor constante de sedimentación es PEI, seguido de poli-L-arginina. Otro dato importante es la capacidad que tienen los polímeros Kemira-C581 y Kemira C-573 para mantener velocidades de sedimentación y capacidad de remoción celular semejante aún cuando la viabilidad del cultivo disminuye.

Los resultados mostraron que los polímeros más efectivos fueron aquellos que poseen un peso molecular bajo (poli-L-histidina, PEI, poli-L-arginina y poli-L-lisina DL). Zhou & Franks (2006) mencionan que este tipo de comportamiento es debido a que los polímeros de bajo peso molecular se adsorben y neutralizan la carga opuesta de las partículas, propiciando la atracción de más partículas.

7.2.1. Remoción de proteína del hospedero

La remoción de proteína perteneciente al hospedero fue cuantificada por el método de Bradford, estos ensayos consistieron en evaluar la remoción debida a la acción de los diferentes polímeros, y es de gran importancia porque las PCH son un contaminante principal del producto de interés, la reducción de éstas en etapas tempranas del proceso de purificación disminuye la cantidad de contaminante introducidos en las etapas cromatograficas posteriores. En la Figura 18 se observan los valores de proteína al inicio y al final del experimento de floculación (35 min), a diferentes viabilidades. En este caso se utilizó una única concentración de polímero (100 ppm). Los resultados muestran que debido a la adición de floculante existe remoción de proteína en algunos casos, sobre todo en aquellos en donde fueron adicionados poli-L-aminoácidos; esta situación se ve aumentada en etapas tardías donde la cantidad de proteína del hospedero es alrededor de $250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, y la remoción es del 90% para poli-L-Ortina, poli-L-Arginina, poli-L-Histidina y poli-L-Lisina DL. Este comportamiento es atribuido a las características de las proteínas pertenecientes a las células CHO, las cuales se ha reportado que tienen un pI bajo y por lo tanto a pH 6.8 – 7.4 se encuentran cargadas negativamente (Mahler *et al.*, 2006). En la mejor condición de remoción celular polímeros como polietilenimina, Kemira-C573 y Kemira-C581 no presentan diferencias significativas en cuanto a remoción de PCH (prueba *t*, $\alpha=0.05$). Existen reportes que indican este comportamiento para polietilenimina (Glynn, 2008; Cordes *et al.*, 1990), en donde la cantidad de proteína o no es reducida o solamente en un porcentaje menor a 15%.

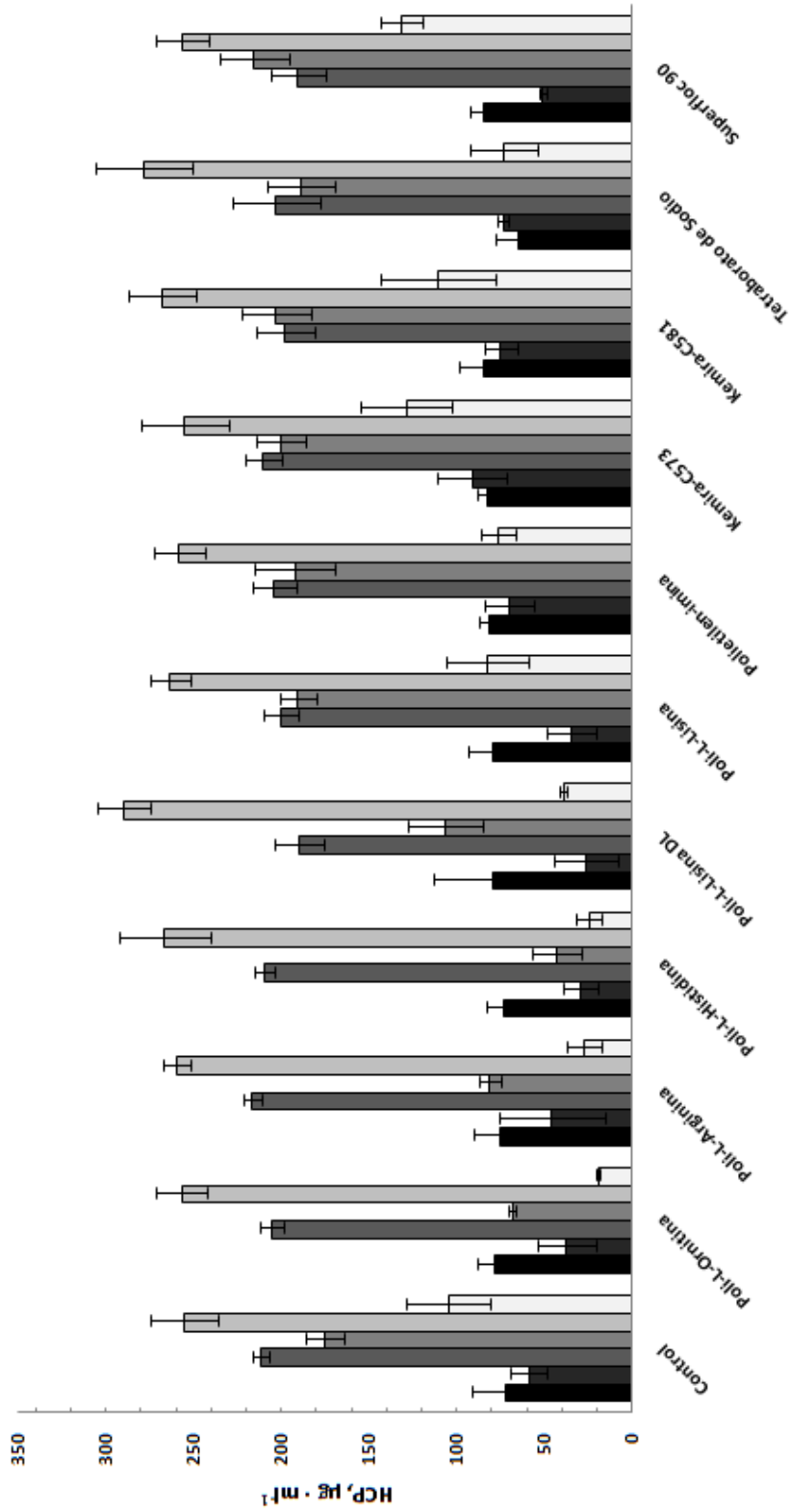


Figura 18. Concentración de proteína del hospedero en el sobrenadante.

Se muestra la remoción de proteína perteneciente al hospedero en el sobrenadante debido a la adición de flocculante. La cuantificación se llevó a cabo a partir de cultivos clarificados con distintas viabilidades, se establecen los tiempos 0 y final como la cuantificación de proteína previa y post a la adición del flocculante, de modo que: 90% de viabilidad (■) 70 y 70% de viabilidad (▒) y 50% de viabilidad (□). El control indica que no fue adicionado flocculante. Las barras de error representan la desviación media de experimentos realizados por duplicado.

7.2.2. Remoción de ADN

Como se mencionó anteriormente el ADN remanente en el sobrenadante es considerado un contaminante dado que pudiera contener oncogenes y producir cáncer, debido a esto la regulación indica que los niveles permitidos para este contaminante son 10 pg por vial de biofármaco. En este caso la cuantificación fue llevada a cabo por medio de PicoGreen (ver sección 6.4.3). La Figura 19 reporta el porcentaje de remoción de ADN por cada uno de los polielectrolitos utilizados a diferentes viabilidades del cultivo celular, los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado.

A las 120 h, tiempo en el cual la viabilidad comienza a decrecer (<90%), la respuesta en fluorescencia debido a la presencia de ADN en el sobrenadante fue de $1,850 \pm 60$ URF (211 ± 6.8 ng · ml⁻¹), mientras que para las 240 h ($\leq 70\%$) y 288 h ($\leq 50\%$) fue de $7,100 \pm 100$ y $8,500 \pm 80$ URF (810 ± 8.4 y 970 ± 9.1 ng · ml⁻¹), respectivamente. Lo anterior fue debido a que en bajas viabilidades existe presencia de lisis celular y por lo tanto la liberación de ADN hacia el sobrenadante.

La gráfica muestra que tanto los poli-L-aminoácidos como la polietilenimina son altamente eficaces para remover ADN del sobrenadante, no importando la cantidad que esté presente en el medio, esto dado que a 50% de viabilidad existe 3 veces más ADN que a 90 % de viabilidad (Figura 15). Superfloc 90 y tetraborato de sodio no mostraron la capacidad de remover ADN, ya que las cantidades fueron muy similares a las observadas en el control, mientras que la Kemira C-581 y Kemira C-573 removieron ADN en la medida que este se encontrara en mayor abundancia. En la literatura referente a los polímeros utilizados en este trabajo solo se encuentra reportado el efecto de PEI sobre la reducción de ADN en el sobrenadante. Salt y colaboradores (1995) reportan una remoción de entre 80 y 90% de ADN proveniente de un homogenizado de levaduras. Cordes *et al.* (1990) reporta una remoción de hasta el 98% del total de ADN, situación muy similar a nuestra cifra de 97.6%.

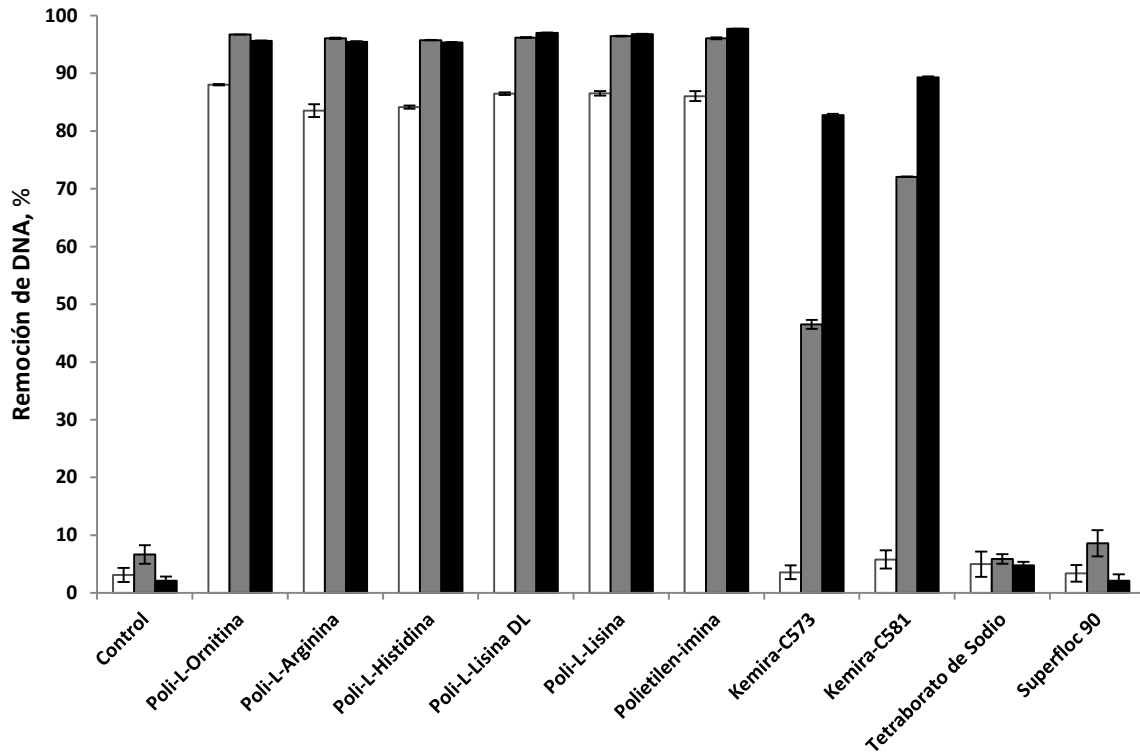


Figura 19. Remoción de ADN

Se muestra el porcentaje de remoción de ADN en el sobrenadante debido a la adición de floculante. Los sobrenadantes provienen de cultivos de células CHO-K1 y las mediciones se llevaron a cabo para tres porcentajes de viabilidad, □ 90%, ■ 70% y ■ 50%, con una concentración de floculante de 100 ppm. El control indica que no fue adicionado floculante. Las barras de error representan la desviación media de experimentos realizados por duplicado.

7.2.3. Selección del mejor polímero para la caracterización subsecuente

La Tabla 8 enlista las características que se tomaron en cuenta para la selección del polielectrolito a ser utilizado en los ensayos posteriores de trabajo, los cuales involucran la determinación de la interacción entre la proteína de interés y el polielectrolito.

Entre los parámetros más importantes destaca la capacidad del polielectrolito para remover células y en qué tiempo sucede esto. En particular estas cualidades son cubiertas

satisfactoriamente por la polietileimina, aunque los poli-L-aminoácidos contaron también con una alta capacidad para remover células. Por otra parte, la PEI tiene la gran ventaja sobre los poli-L-aminoácidos de ser de menor costo (100 veces menos), lo que repercutiría positivamente en su posible aplicación industrial. Aunque la PEI no cuenta con una aprobación por la FDA para su utilización, se menciona como no tóxico por Salt *et al.* (1995), y dadas sus características de carga y peso molecular puede ser removido fácilmente en etapas subsecuentes del proceso de purificación.

Tabla 8. Atributos de polielectrolitos utilizados.

Atributos	Bórax	SF90	Kemira C-573	Kemira C-581	PEI	Poli-L-Arginina	Poli-L-Histidina	Poli-L-Ornitina	Poli-L-Lisina	Poli-L-Lisina DL
<i>Positivos</i>										
Mejor capacidad para remover células					✓	✓	✓	✓	✓	✓
Menor tiempo para clarificar					✓					
Menor concentración necesaria										✓
Mayor capacidad para remover ADN					✓	✓	✓	✓	✓	✓
Mayor capacidad para remover PCH						✓	✓		✓	
Efectividad en rangos de pH/viabilidad			✓	✓						
Menor costo	✓	✓	✓	✓	✓					
Aprobaciones FDA/NSF	✓	✓	✓	✓						
Diferencias de P.M. con proteínas de interés	✓				✓	✓				✓
<i>Negativos</i>										
Menor capacidad para remover células	X									
Menor capacidad para remover ADN	X	X	X	X						
Menor capacidad de remover PCH	X	X	X	X	X				X	

7.3. Caracterización de glicoproteínas modelo

La caracterización inicial de las glicoproteínas modelo tuvo como objetivo la identificación de algunas de sus propiedades estructurales (presencia de glicanos, pureza, tamaño, poblaciones de carbohidratos con carga y estructuras de carbohidratos) esto con el fin de identificar si alguna de ellas condicionaba la selectividad del polímero seleccionado.

7.3.1. Determinación de pureza y presencia de glicanos

Se determinó la pureza de Xolair en un gel de SDS-PAGE al 12% (Figura 20A), por medio de densitometría (software ImageJ). El carril 1 muestra un control positivo de glicosilación (transferrina), el 2 un anticuerpo IgG purificado de suero de humano (Sigma-Aldrich), el 3 el IgG Xolair y finalmente en el carril 4, un control negativo de glicosilación (lisozima). Se visualizan bandas típicas pertenecientes a los anticuerpos en condiciones desnaturalizantes, la fracción conservada de 50 kDa y la fracción variable correspondiente a 25 kDa (Lund *et al.*, 1995), con una pureza superior al 95% para Xolair. En el Western-Blot (Figura 20B) se visualizaron bandas que representan la glicosilación de las proteínas, en el control positivo a 75 kDa, y para las muestras de anticuerpos se observan a 50 kDa, además de ruido de fondo en los carriles 2 y 3. En el carril del control negativo (4) no se observó ninguna banda.

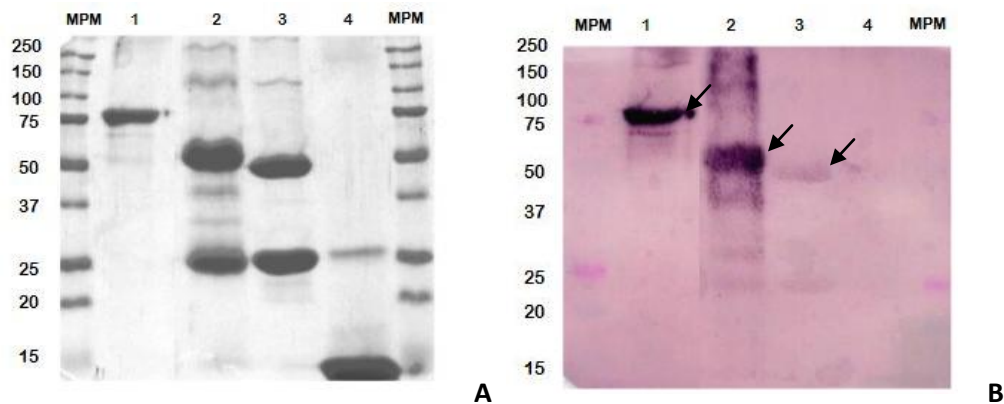


Figura 20. Pureza y detección de carbohidratos de Xolair.

A. SDS-PAGE al 12%, **B.** Western-Blot para detección de glicanos.

MPM: Marcador de peso molecular, **1.** Transferrina (C+), **2.** IgG suero de humano, **3.** Xolair, **4.** Lisozima (C-). Las flechas en **B.** indican las bandas de proteínas que contienen oligosacáridos.

De igual forma, se determinó la pureza de la EPO y aEPO en un gel de SDS-PAGE al 12% (Figura 21A), por medio de densitometría (software ImageJ), así como la detección de glicanos por medio de un Western-Blot (Figura 21B y Figura 21C). La pureza determinada por el análisis de imagen fue superior al 98% para EPO y aEPO. En el gel de SDS-PAGE se observó una banda amplia en el peso molecular de 39 kDa correspondiente a EPO y un ligero decremento en el peso molecular para la aEPO (Figura 21A), esto ya que ha perdido residuos de ácidos siálicos los cuales forman parte importante (1-14 mol/mol de EPO) de la proteína. Este decremento en el peso molecular debido a la pérdida de ácidos siálicos en la molécula de eritropoyetina también ha sido visualizado en gel de SDS-PAGE por Higuchi (2009). En cuanto a la detección de glicanos, EPO y aEPO se encuentran altamente glicosiladas (Figura 21B). La Figura 21C muestra una detección específica de ácido siálico, mientras que la EPO y el control positivo (transferrina) contienen este carbohidrato, se corrobora su ausencia en la aEPO. En el carril del control negativo (4) no se observó ninguna banda.

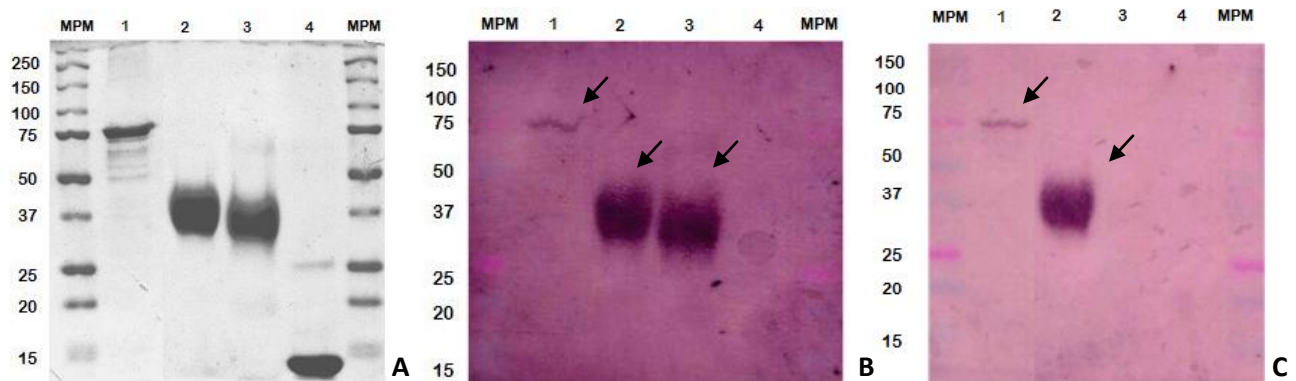


Figura 21. Pureza y detección de carbohidratos de eritropoyetina y asialoeritropoyetina.

A. SDS-PAGE al 12%, **B.** Western-Blot para la detección de glicanos, **C.** Western-Blot para la detección de ácido siálico. **MPM:** Marcador de peso molecular, **1.** Transferrina (C+) **2.** Eritropoyetina, **3.** Asialoeritropoyetina, **4.** Lisozima (C-). Las flechas en **B** y **C** indican las bandas de proteínas que contienen oligosacáridos.

7.3.2. Determinación de diámetro hidrodinámico

Por otra parte, se midió el diámetro hidrodinámico del AcMo (Figura 22A) teniendo como resultado una única población (99.2%) con un DH de 11.6 ± 1.1 nm. Este valor es similar a lo reportado para una IgG por Imrem *et al.*, (2007) y Nobbman *et al.*, (2007). En el caso de EPO y aEPO se obtuvieron DHs de 6.5 ± 0.6 y 5.7 ± 0.8 nm (Figura 22B y 22C) con identidades de las poblaciones superiores al 99.6% en cada uno de los casos. También se evaluó el DH de la polietilenimina (Figura 22D) el cual resultó ser de 5.9 ± 2.2 (única población). Las tres proteínas y la PEI se encuentran disueltos en buffer de fosfatos 0.05 M, pH 6.8 con una concentración de proteína de $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ y 100 ppm de polielectrolito; los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

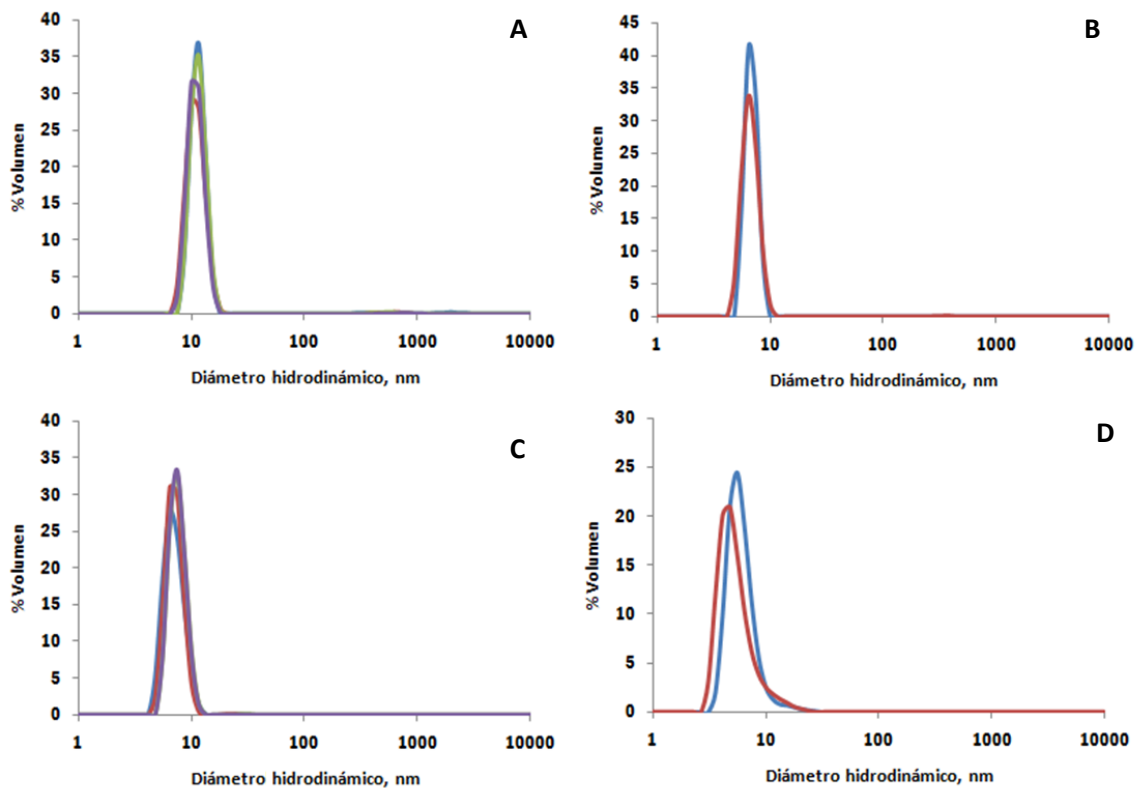


Figura 22. Diámetro hidrodinámico de proteínas y polielectrolito.

A. Xolair, **B.** Eritropoyetina, **C.** Asialoeritropoyetina, **D.** Polietilenimina.
Las gráficas muestran las lecturas de diámetro hidrodinámico por triplicado.

7.3.3. Determinación de poblaciones con carga

La caracterización de las glicoproteínas Xolair y EPO por medio de cromatografía de intercambio aniónico débil mostró claramente las diferencias existentes entre ellas en cuanto a la distribución de poblaciones de carbohidratos con carga. Mientras el anticuerpo monoclonal mostró una población única de carbohidratos neutros, la EPO mostró todo el conjunto completo de poblaciones cargadas negativamente por la presencia de ácido siálico capaces de existir en una glicoproteína (Figura 23). En este último caso, se aprecia que los glicanos más abundantes son los tri- (27.2%) y tetrasializados (64.2 %), lo cual indica que más del 90% del total de glicanos contienen al menos 3 ácidos siálicos y preferencialmente 4, siendo la población asializada solamente un 2.2% (Figura 24). Restelli *et al.* (2006) reporta un cromatograma de WAX-HPLC de EPO producida en células CHO similar al obtenido en este trabajo.

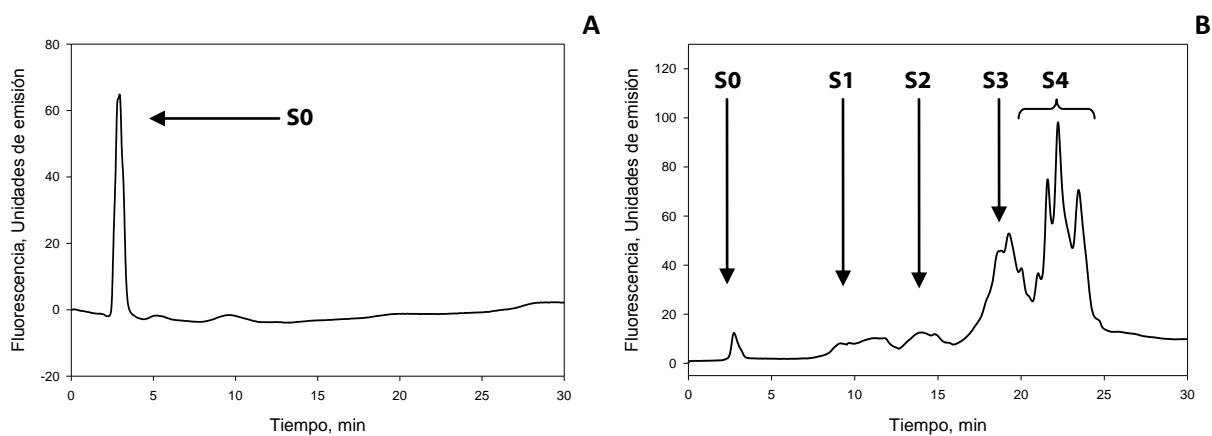


Figura 23. Cromatogramas de intercambio aniónico débil.

A. Xolair, **B.** Eritropoyetina.

S0: población de glicanos neutros, **S#:** indica el número de ácidos siálicos presentes en la población de oligosacáridos.

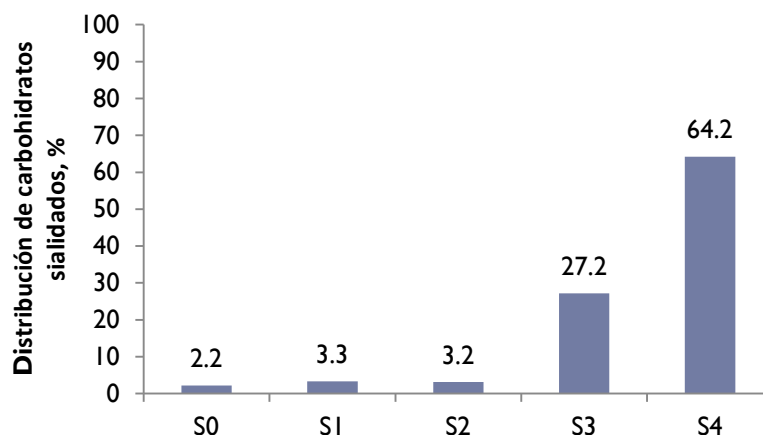


Figura 24. Distribución porcentual en eritropoyetina de poblaciones de carbohidratos con carga.

S0: población de glicanos neutros, **S#:** indica el número de ácidos siálicos presentes en la población de oligosacáridos.

7.3.4. Determinación de patrones de glicosilación

La determinación puntual de las estructuras pertenecientes al anticuerpo monoclonal tuvo como resultado un perfil de glicosilación típico para un IgG. En el cromatograma (Figura 25) se observan 10 picos. Las estructuras fueron propuestas realizando digestiones con diferentes exoglicosidasas como se describe en la sección 6.8.2 y comparando su migración (en unidades de glucosa) con una base de datos (GlycoBase NIBRT); esto permitió la identificación del total de estructuras. Como se puede observar, arriba del 90% de los glicanos fueron estructuras correspondientes a N-glicanos biantenarios, fucosilados y no bisectados. La población mayoritaria de glicanos fue G0 ($\approx 60\%$), seguida de G1 ($\approx 30\%$) (Tabla 9). Cabe destacar que este anticuerpo no presentó estructuras con ácido siálico, pero sí estructuras con dos galactosas terminales. La Tabla 9 muestra las estructuras identificadas, su representación gráfica y el porcentaje relativo al total de la población (%RTP) que ocupan.

Staldmann y colaboradores (2008) realizaron un estudio de las estructuras de glicanos encontradas en diferentes anticuerpos monoclonales utilizados como biofármacos, entre ellos Xolair. Dicho estudio se llevó a cabo mediante espectrometría de masas, a diferencia de los obtenidos en este trabajo que fueron obtenidos a partir de HPLC-FN y tratamiento con exoglicosidasas. La comparación de resultados indica una gran similitud, ellos reportan 9 estructuras de las cuales se comparten 7 con porcentajes relativos al total de población

semejantes. Las diferencias encontradas con respecto a Staldmann *et al.* (2008) son en glicanos con %RTP menores al 5%, M5A1 y A2G1 reportados por estos autores, A1 y A2G1F en este trabajo. El glicano representativo es consistente en ambos estudios y es A2G0F, de igual forma el segundo en %RTP A2G1F. Los datos de Staldmann y colaboradores (2008) se incluyen en la Tabla 10 como comparación con los datos obtenidos en este trabajo.

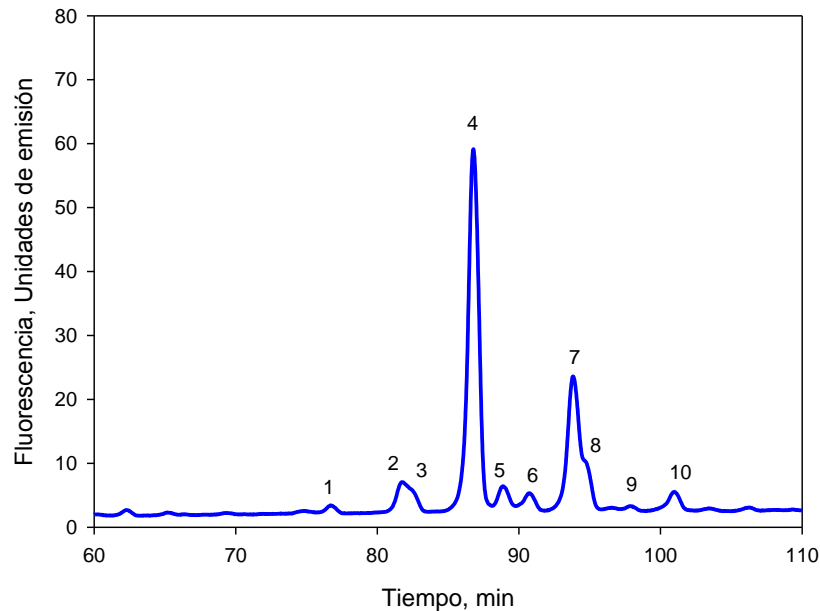


Figura 25. Perfil de glicosilación de Xolair.

La numeración indica la estructura de oligosacárido propuesta en la Tabla 9.

Tabla 9. Distribución porcentual en Xolair de poblaciones de carbohidratos.

Tipo de glicano	%
Paucimanosa	4.24
Altos en manosa	3.69
G0	59.17
G1	29.12
G2	3.79
G3	0
G4	0
Sialilados	0

En correspondencia a nuestros resultados, no se encontraron glicanos bisectados ya que la proteína fue producida en células CHO carentes de N-acetilglucosaminil transferasa III y la mayor parte de la población se encontró galactosilada y fucosilada.

Tabla 10. Estructuras de carbohidratos presentes en Xolair.

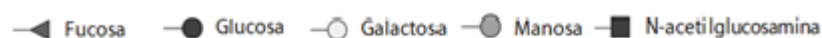
	Glicano	Estructura	Abundancia, %	Abundancia ^a , %	Abundancia ^b , %
1	A1		2.04	3.76	-
2	A1F		2.20	4.06	2.8
3	A2G0		5.03	9.29	5.5
4	A2G0F		54.14	100	100
5	M5		3.69	6.81	8.5
6	A2G1F		2.82	5.20	-
7-8	A2G1F		26.30	48.57	58.4
9	A2G2		1.02	1.88	1.2
10	A2G2F		2.77	5.11	6.9

^a Abundancia de carbohidratos de Xolair asignando el 100% a la estructura principal (4).

^b Abundancia de carbohidratos de Xolair asignando el 100% a la estructura principal (4), datos obtenidos por Staldmann y colaboradores (2008).

La numeración corresponde a los picos identificados en el cromatograma de la Figura 25.

Los corchetes indican que se desconoce la ubicación y tipo de enlace del residuo de azúcar.



De igual forma se identificaron las glicofomas correspondientes a eritropoyetina, las cuales tienen características muy diferentes a las encontradas en el anticuerpo monoclonal. En primera instancia, se puede observar en el cromatograma (Figura 26) que los tiempos de retención en los cuales comienzan a eluir los glicanos pertenecientes a EPO ($Tr > 100$ min), son tiempos en los cuales ya han eluido los carbohidratos correspondientes a un AcMo. Esto se debe principalmente a la carga que contienen las estructuras y en segundo término a su tamaño. Es decir, los glicanos contenidos en EPO cuentan con una carga negativa; esto fue corroborado con los resultados obtenidos por WAX-HPLC.

En particular, se identificaron catorce picos en el cromatograma de EPO (Figura 26), teniendo como estructuras principales las correspondientes a los picos 6-14 (Tabla 11). Se puede observar que las estructuras predominantes son tetrantenarias fucosiladas y que contienen entre tres y cuatro ácidos siálicos, otra característica importante es que cuenta con residuos adicionales de N-acetilglucosamina y galactosa (N-acetil lactosamina). Las estructuras principales propuestas son A4G4S4F ($\approx 18\%$), A4Lac1S3F ($\approx 12\%$), A4G4Lac1S4F ($\approx 20\%$) y las estructuras correspondientes a los picos 10 a 14 que conforman alrededor del 25% del porcentaje relativo al total de la población y que se proponen son glicanos de la forma A4G4Lac(x)S(x)F (6.77%, 12.07%, 2.59% y 4.15%). En el último caso, este tipo de estructuras podrían corresponder a 4 glicofomas en donde no fue posible identificar el número de lactosaminas, pero claramente se trata de glicanos tri- y tetrasialidados. En resumen, se puede establecer que la estructura que sobresale de la población es A4G4Lac1S4F.

Existen trabajos donde el objetivo de estudio ha sido determinar el efecto de las condiciones de cultivo, tales como oxígeno disuelto (Restelli *et al.*, 2006), temperatura (Ahn *et al.*, 2008) y concentración de amonio (Yang & Butler, 2000) sobre el perfil de glicosilación de EPO producida en células CHO. Estos estudios, en concordancia con nuestro trabajo, han demostrado que las estructuras predominantes son tetra-antenarias, fucosiladas, tri- o tetrasialidadas y que EPO contiene entre una y tres extensiones de lactosaminas. Lo anterior ha sido corroborado por diferentes técnicas entre las que se encuentran HPLC en fase normal, fase reversa, MALDI-TOF y tratamiento con exoglicosidasas.

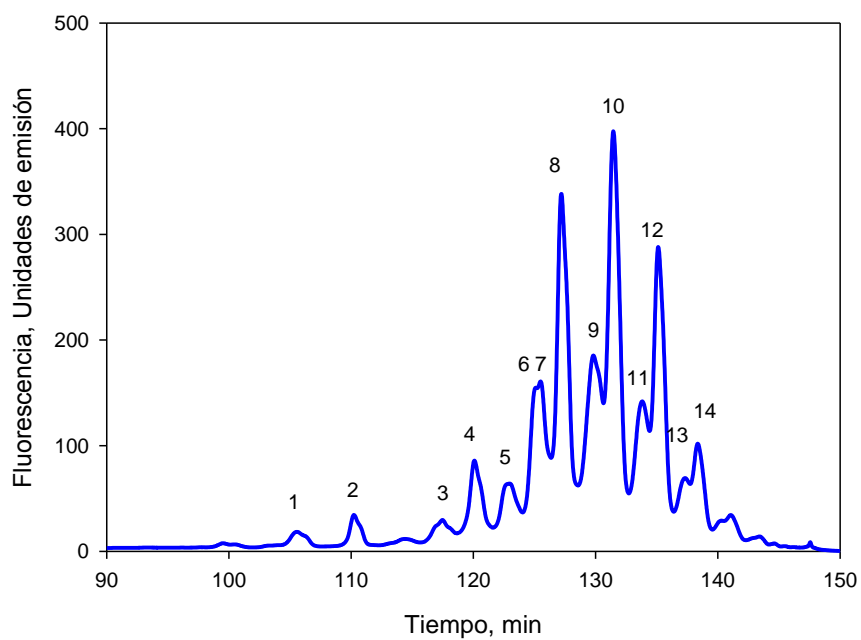


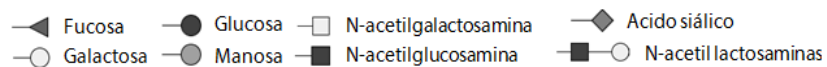
Figura 26. Perfil de glicosilación de Eritropoyetina.

La numeración indica la estructura de oligosacarido propuesta en la Tabla 10.

Tabla 11. Estructuras de carbohidratos presentes en eritropoyetina.

	Glicano	Estructura	%
1	A2G2F / A2G2S2		0.95
2	A3G3F / A3G3S1		1.4
3	A4G4F		2
4	A4G4S2		5.3
5	A4G4S3		4.7
6	A4G4S3F		4.6
7	A4G4S3F		6.7
8	A4G4S4F		18
9	A4G4Lac1S3F		11.7
10	A4G4Lac1S4F		19.6
10-14	A4G4Lac(x)S(x)F		24.9

La numeración corresponde a los picos identificados en el cromatograma de la Figura 26. Los corchetes indican que se desconoce la ubicación y tipo de enlace del residuo de azúcar. #X se refiere al número de ácidos siálicos presentes en el oligosacárido.



7.4. Interacción proteína – polielectrolito

Como se ha mencionado anteriormente el objetivo principal de trabajo fue evaluar el impacto del uso de polielectrolitos en el proceso de purificación de proteínas recombinantes de uso terapéutico. Existen varios reportes sobre la reducción de contaminantes en el sobrenadante utilizando células CHO como modelo de estudio. Por ejemplo, Glynn, 2008; Wickramasinghe *et al.*, 2004 y Han *et al.*, 2002 han aplicado diferentes polímeros como polietilenimina, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, PEG 4000 y polímeros comerciales como CYSEP4052 para llevar a cabo tal objetivo. Existen estudios en donde el interés se centra en la clarificación de caldos de cultivo (disminución de contaminantes como restos celulares, PCH y ADN) de anticuerpos monoclonales producidos en células de mamífero utilizando polímero en combinación con la microfiltración (Riske *et al.*, 2007; Peram *et al.*, 2010). Entre los floculantes reportados destacan el quitosán, la poli-L-arginina, la polivinilamina, la poli-N-metilvinilamina, la polietilenimina y el polidialildimetil cloruro de amonio, todos ellos conteniendo cargas positivas y por lo tanto denominados policationes. Sus resultados demuestran que no existe un impacto negativo en la recuperación de los anticuerpos monoclonales, teniendo rendimientos superiores al 97%. Sin embargo, no se encuentra documentado en la literatura si los polímeros pudieran interactuar con la proteína de interés debido a su heterogeneidad de cargas en un proceso de clarificación en donde se han utilizado polielectrolitos. McDonald y colaboradores (2008) reportan el uso de ácido polivinilsulfónico, ácido poliacrílico y ácido poliestirensulfónico en etapas de purificación como alternativa a la cromatografía de intercambio iónico. En este caso se explotan las características de los polímeros de carga opuesta a la proteína de interés para la formación de un complejo que pueda ser fácilmente recuperado.

En este trabajo se identificó un polielectrolito (PEI) con la capacidad de propiciar una alta remoción celular, así como de impurezas presentes en el medio cultivo en donde se encuentra un producto de interés en un proceso de recuperación primaria. Además el objetivo principal fue evaluar si la acción de este polímero causaría algún efecto sobre el producto. Para esto, se utilizaron dos modelos de estudio: un anticuerpo monoclonal (Xolair) y EPO. Estas glicoproteínas se seleccionaron debido a las diferencias que existen estructuralmente entre ellos (peso molecular, carga, perfil de glicosilación y punto isoeléctrico). Por lo tanto en los siguientes ensayos las proteínas se mantuvieron en un pH y concentración similar al que se encontrarían en la etapa de recuperación primaria. El buffer utilizado fue de fosfatos, manteniendo un pH de 6.8, la concentración de AcMo de $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, y la de eritropoyetina fue de $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

El primer indicio de interacción se comprobó por medio de la cuantificación de las proteínas después de la interacción con el polímero seleccionado como el mejor para reducir los niveles de impurezas (polietilenimina). El ensayo consistió en la adición de floculante a una concentración de 100 ppm a la solución que contenía a la glicoproteína. Después de mezclar la solución y dejar interaccionar durante 30 min, se centrifugó a 10,000 rpm y recolectó el sobrenadante para cuantificar la concentración de proteína recombinante (ELISA para anticuerpo monoclonal y método de Bradford para eritropoyetina). Los resultados obtenidos mostraron que para el anticuerpo monoclonal existió una remoción de entre el 3 y 5 % mientras que para la EPO entre el 60 y 70%. Es decir, en el sobrenadante colectado el anticuerpo se encontraba en una concentración de $0.96 \pm 0.016 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ y la EPO en $38 \pm 7.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Los resultados concuerdan con lo obtenido por Riske *et al.*, (2007) y Peram *et al.* (2010) en lo concerniente a anticuerpo monoclonal, ya que la concentración en el sobrenadante no fue afectada. En el caso de EPO la concentración disminuyó drásticamente con lo cual se comprobó que existe una interacción entre la proteína y el polielectrolito adicionado.

7.4.1. Determinación de interacción proteína – polielectrolito por WAX-HPLC y HPLC-FN

Se procedió a evaluar si de manera particular las proteínas interactuaban con la PEI por medio de sus oligosacáridos. Esto fue corroborado por WAX-HPLC y HPLC-FN. La Figura 27A muestra el cromatograma de WAX-HPLC de Xolair de la muestra proveniente del experimento descrito anteriormente comparado con un control de la proteína que no fue expuesto a la interacción con polietilenimina. Como se puede observar, los cromatogramas se sobrelapan sin mostrar un cambio aparente. De igual forma, los cromatogramas de HPLC-FN (Figura 27B), en donde se visualizan las poblaciones de carbohidratos pertenecientes al anticuerpo monoclonal, también se traslapan. Por otra parte, se pueden observar claramente la disminución en las poblaciones de carbohidratos sialilados de EPO (Figura 27C), así como el tipo de estructuras que son afectadas (Figura 27D). En este caso, las poblaciones de carbohidratos removidas correspondieron a A4G4S3F, A4G4S4F, A4G4Lac1S3F, A4G4Lac1S4F y A4G4Lac(x)S(x)F, siendo las últimas las que contenían la mayor cantidad de ácido siálico y residuos de lactosamina. También se observa que los residuos A2G2F / A2G2S2, A3G3F / A3G3S1 y A4G4F mantuvieron un porcentaje similar.

Cabe destacar que las glicofomas removidas del sobrenadante son las que se reportan con mayor actividad biológica (Spivak, 2000), por lo cual no es deseable su reducción, sin embargo dado que se ha probado tal interacción es posible que en otras condiciones (medio clarificado conteniendo EPO) al que se le adicione PEI, esta sirva como análogo de una purificación por intercambio iónico, recuperando las glicofomas con mayor actividad.

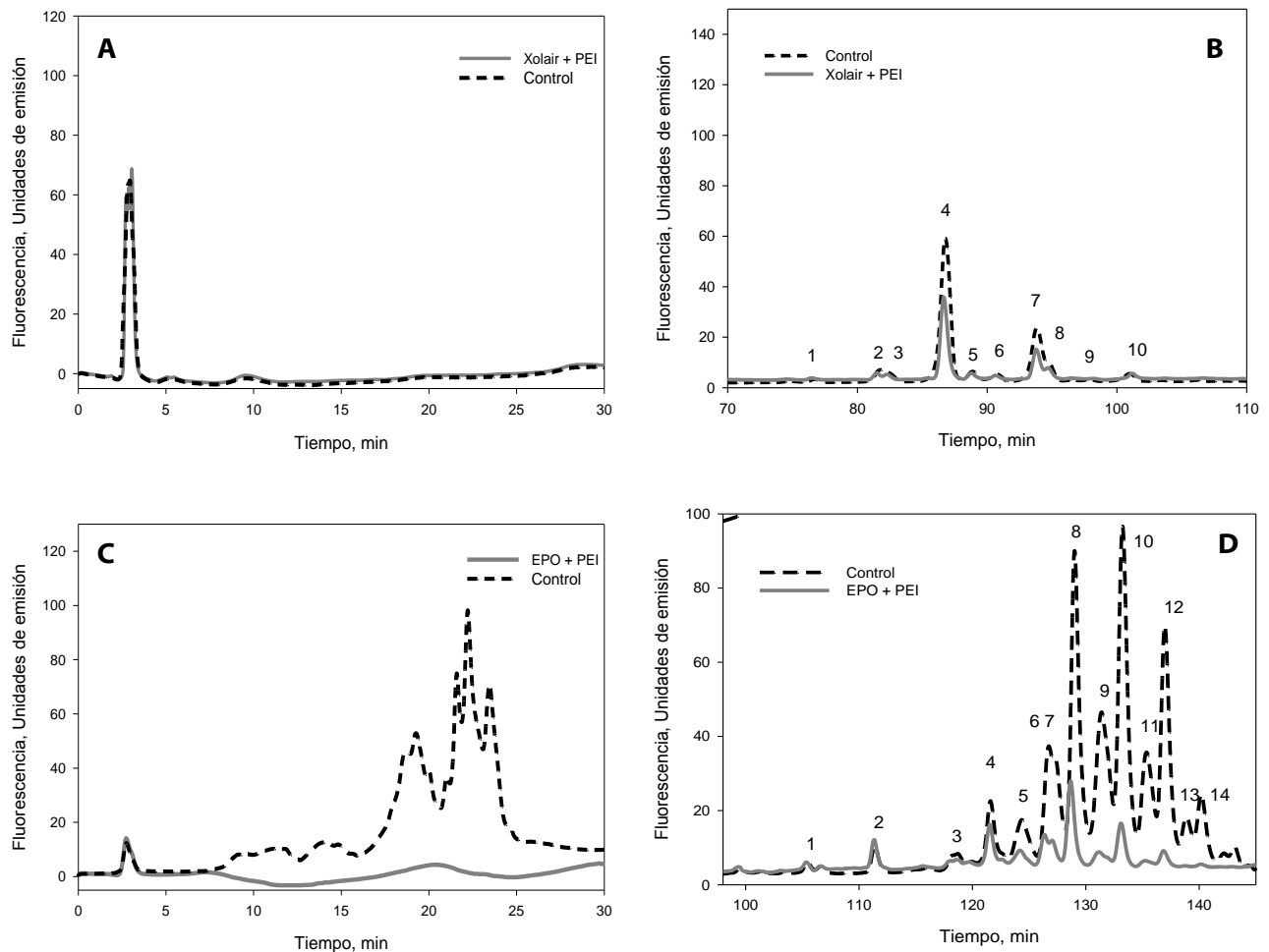


Figura 27. Cromatogramas WAX-HPLC y HPLC-FN de interacción proteína-polielectrolito.

A. Xolair WAX-HPLC, **B.** Xolair HPLC-FN, **C.** Eritropoyetina WAX-HPLC, **D.** Eritropoyetina HPLC-FN. En **D.** los oligosacáridos que su %RTP fue disminuido drásticamente debido a la acción de del polímero son los indicados con la numeración 6 a 14.

7.4.2. Determinación de interacción proteína – polielectrolito por DLS

La interacción proteína polielectrolito también se pudo visualizar mediante el cambio de diámetro hidrodinámico (DH) medido por dispersión dinámica de luz (Apéndice B). Es decir, si la proteína no interactúa con el polímero no se debe observar cambio en el DH medido; el caso contrario sugeriría una posible interacción. Como se mencionó anteriormente el DH de Xolair es de 11.8 ± 1.1 nm. También se decidió utilizar un IgG purificado de suero de humano como control (Sigma Aldrich), el cual tiene un DH de 12.4 ± 3.1 nm. Los DH disminuyeron a 10.4 ± 2.9 nm y 9.9 ± 1.3 nm respectivamente, al adicionar el polielectrolito (Figura 28). Por medio de una prueba *t*, se determinó que no existieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los DH promedio del control y la muestra a la cual se le adicionó PEI, por lo tanto las moléculas no interaccionan. Para eritropoyetina el DH registrado fue de $6.5 \text{ nm} \pm 0.6 \text{ nm}$, correspondiente a una proteína de 42 kDa; al ponerse en contacto con polietilenimina el DH aumentó 1.6 veces, indicando así una interacción con la EPO (Figura 29), esto fue corroborado estadísticamente de la misma forma que con los AcMos.

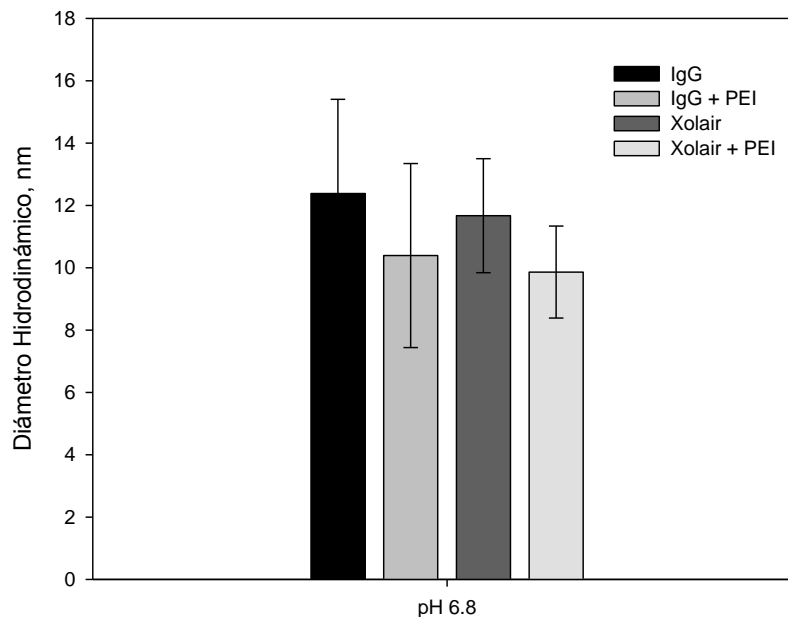


Figura 28. Interacción IgG-PEI por DLS.

Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos.

Por lo anterior y por los resultados obtenidos en cromatografía de intercambio aniónico débil se decidió realizar un ensayo para determinar si los ácidos siálicos influyen sobre la interacción EPO-PEI, dado que éstos determinan parcialmente las cargas de la proteína (Byrne *et al.*, 2007). Es decir la carga neta de EPO está directamente relacionada con la presencia y cantidad de estos residuos de carbohidratos (Davis & Arakawa, 1987). Para esto, se removieron los ácidos siálicos de EPO por un método químico (ver sección 6.6.1) produciendo de esta manera aEPO. Se corroboró la remoción de residuos de ácidos siálicos por medio de un gel de SDS-PAGE y por Western-Blot (ver sección 6.6). En este caso la aEPO registró un DH de 5.7 ± 0.8 nm e incrementó más de 200 veces al adicionar PEI (Figura 29). Este resultado involucra el cambio de pI de la proteína dado que en su forma nativa su pI es de 4.4–5.1 (Jacques de Ceaurriz, 2000), y al perder los residuos de ácido siálico eleva su pI a 6.4 - 7.5 (Higuchi, 2009). Por lo tanto, la proteína se encuentra cercana a su punto isoeléctrico lo cual propicia la interacción proteína – proteína produciendo aglomerados reflejados en el aumento de DH y posiblemente también la interacción con el polímero por medio de parches electrostáticos. Debido a esto, se cambiaron las condiciones de pH para evitar este fenómeno (para lo cual se utilizó un pH de 5 y 8), en estos pHs se observó que la muestra que contiene EPO y PEI aumenta su DH 1.3 veces con respecto a la muestra que solo contiene EPO, siendo la diferencia en los promedios obtenidos significativa. Por otra parte, en los mismos pHs las muestras que contiene aEPO y PEI no muestran un cambio en su promedio de DH con respecto a la que contiene solo aEPO. En los ensayos anteriores, la prueba *t*, determinó que sí existieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los promedios de DH de EPO control y la muestra que contenía la proteína con polielectrolito, esto para todas las condiciones de pH (5, 6.8 y 8), así como en las mediciones de aEPO y aEPO-PEI en pH 6.8. Para la comparación de medias entre aEPO y aEPO-PEI a pHs 5 y 8 se determinó que no existieron diferencias significativas y por lo tanto las moléculas no interaccionan. Con lo anterior, se demostró que la proteína desialidada no interactúa con el polielectrolito, proponiendo que la unión entre proteína y el polímero es debido a la presencia de ácidos siálicos y no por la proteína *per se*.

Las interacciones entre proteínas y polielectrolitos, en este caso entre EPO y polímeros catiónicos pudieran ser explotadas en etapas de purificación en donde se utilizan columnas de intercambio iónico. Wen y Dubin (1994) demostraron que PDADMAC (Polidialil dimetil cloruro de amonio, el cual es un polímero catiónico) posee una alta selectividad hacia proteínas con pI similar al de BSA (4.7), Wang *et al.* (1996) establecieron que este tipo de selectividad es una buena opción para la separación de fase de mezclas de proteínas. Ellos estudiaron el mismo

prolielectrolito con diferentes proteínas como modelo (BSA, β -lactoglobulina, γ -globulina y ribonucleasa A), obteniendo una buena separación variando el pH, y con ello formando complejoss de manera selectiva.

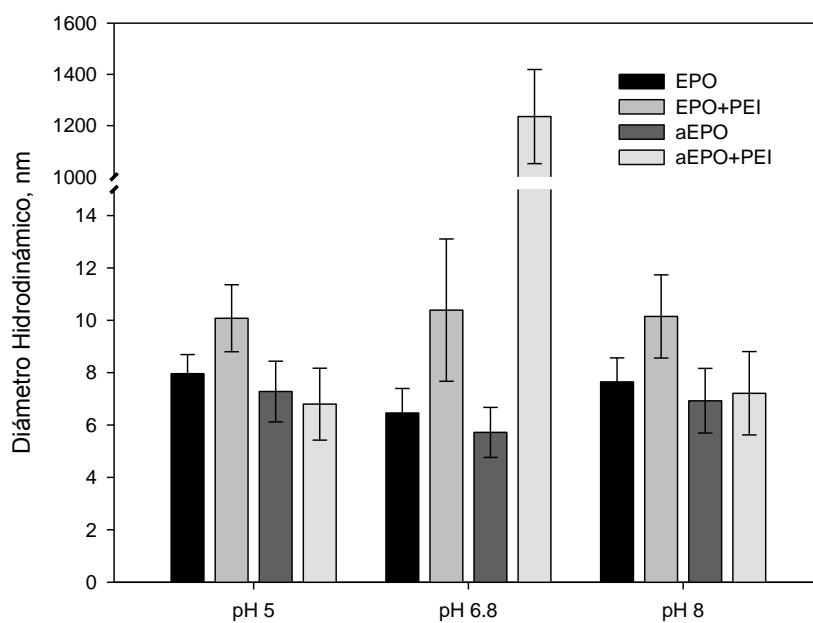


Figura 29. Interacción EPO-PEI y aEPO-PEI por DLS.

Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos.

7.5. Integración del uso de polelectrolito a un proceso de purificación de AcMo

La polietilenimina se integró en un proceso típico de recuperación y purificación de anticuerpo monoclonal, el cual involucra en este caso la floculación de células, restos celulares, proteína del hospedero y ADN. Efectuada esta operación se separaron las células remanentes por centrifugación (10,000 rpm por 5 min), el sobrenadante fue recolectado y concentrado en una celda Amicon con una membrana de celulosa regenerada de 100 kDa de corte (Millipore Corp., MA) y se equilibró con 4 ml de buffer de unión (fosfato de sodio dibásico 20 mM pH 7). El AcMo fue purificado por cromatografía de afinidad por proteína A (ver materiales y métodos). Se evaluó la disminución de ADN y PCH previo a la cromatografía, lo cual tuvo como resultado una disminución superior al 95% en el contenido de ADN en el sobrenadante y una reducción del 5 % de la proteína del hospedero. La concentración de IgG en este punto fue de $0.96 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. La Figura 30 presenta el cromatograma de la purificación del anticuerpo, el cual muestra una fracción pequeña de proteínas contaminantes (tiempo de retención 41 – 55 min). El bajo contenido de proteínas contaminantes es resultado de las condiciones en las cuales se realizó la cosecha (90% de viabilidad) donde la lisis celular aún era mínima.

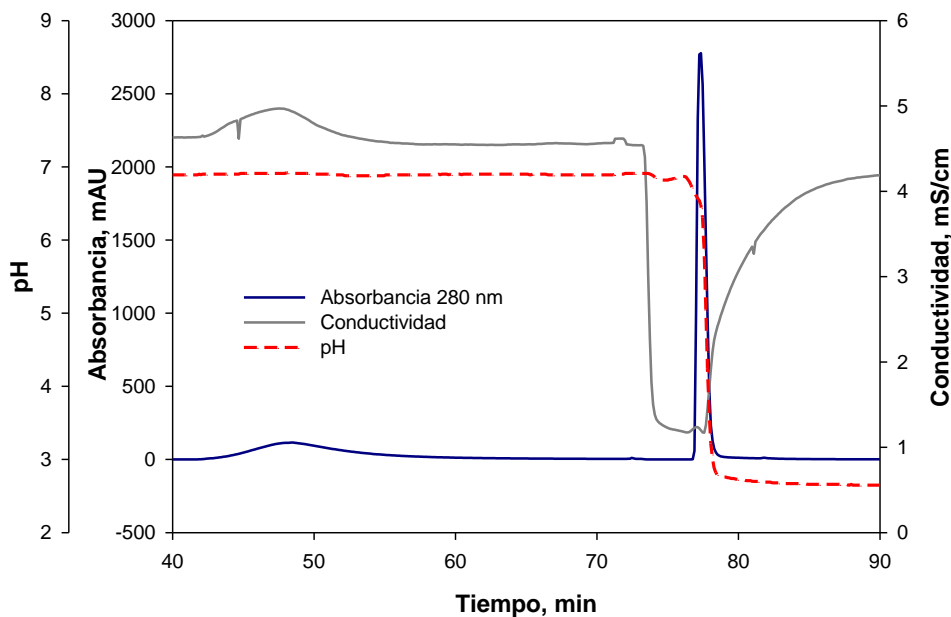


Figura 30. Purificación de anticuerpo monoclonal por cromatografía de afinidad.

La concentración de IgG al final de la purificación fue de $0.93 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. En la Figura 31 se observa en gel de SDS-PAGE cada uno de los pasos seguidos. El carril número 1 del gel contiene el AcMo que ha sido utilizado como control en todos los experimentos, el carril número 2 contiene una muestra del medio de cultivo metabolizado previo a la adición del AcMo y polietilenimina, en este carril se observan bandas tenues debido a la poca cantidad de proteína en el sobrenadante ya que la lisis celular era mínima en este tiempo de cultivo. El carril 3 contiene la muestra al tiempo 0 en el cual se adicionó polietilenimina al medio de cultivo con anticuerpo monoclonal y el carril 4 contiene la muestra al tiempo final. El carril 5 es una muestra de sobrenadante después de la centrifugación y finalmente el último carril contiene Xolair purificado por cromatografía de afinidad. Con estos resultados se pudo cuantificar la pureza del anticuerpo, la cual fue superior al 98% (densitometría, Image J), además se observó que la bandas correspondientes al anticuerpo (fracción pesada y ligera) se mantienen en los pesos moleculares esperados. De manera general, se pudo establecer que la adición de PEI en el proceso de clarificación de un anticuerpo monoclonal sirvió para clarificar el medio de cultivo, y no afectó la concentración del AcMo, además de que se obtuvo un alto nivel de pureza cuando el producto fue purificado por cromatografía de afinidad.

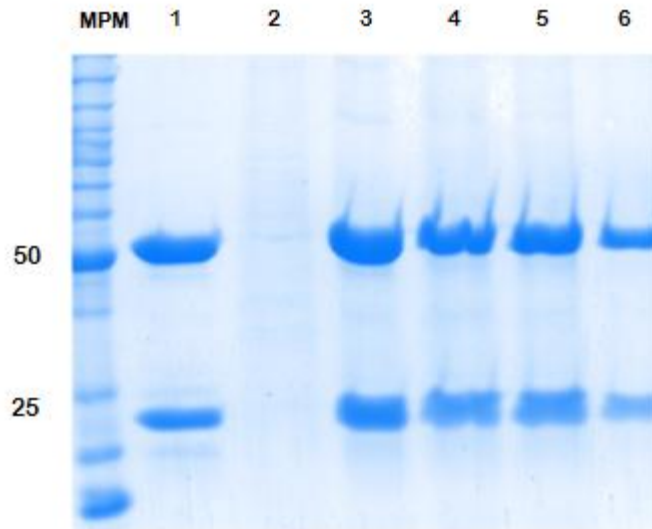


Figura 31. Gel de SDS-PAGE de las etapas de purificación de anticuerpo monoclonal.

MPM. Marcador de peso molecular, **1.** Xolair puro, **2.** Medio de cultivo, **3.** Floculación T0, **4.** Floculación TF, **5.** Centrifugación, **6.** Cromatografía de afinidad.

Finalmente se evaluó el patrón de glicosilación del anticuerpo purificado (Figura 32) para identificar si el %RTP de alguna glicofoma fue modificado. En este caso se observa la misma distribución de glicanos comparado con la muestra control, por lo tanto la adición de polietilenimina no tuvo influencia sobre la distribución de glicofomas encontradas en el sobrenadante ni en los porcentajes relativos de cada glicano. Estos resultados son consistentes debido a que los ensayos de dispersión dinámica de luz, WAX-HPLC y HPLC-FN demostraron que el AcMo no interactúa con el polielectrolito. De tal forma, puede ser posible integrar el uso de PEI a la clarificación de un anticuerpo monoclonal sin afectar su perfil de glicosilación.

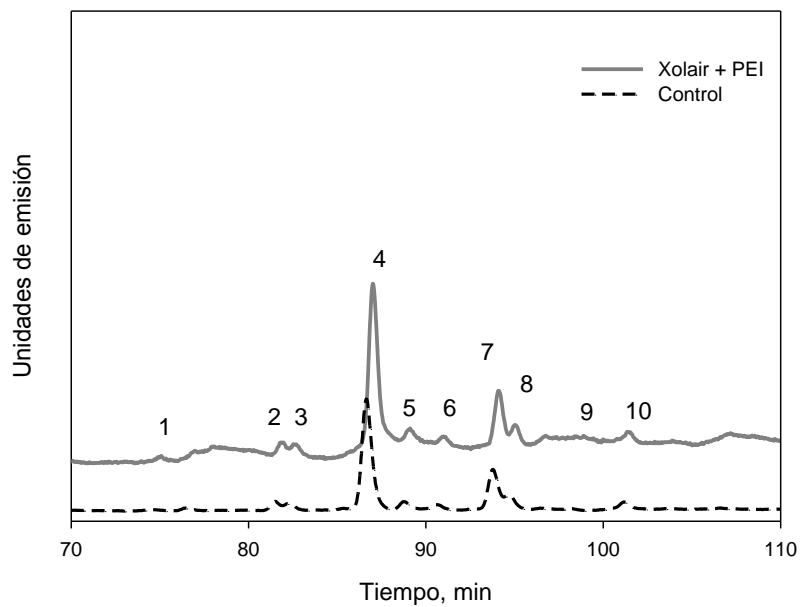


Figura 32. Perfil de glicosilación de anticuerpo purificado

8. CONCLUSIONES

Los poli-L-aminoácidos demostraron ser eficientes para la reducción del contenido celular al ser empleados en una viabilidad de 90%. Se observó que la capacidad de los poli-L-aminoácidos para flocular las células disminuye con el decremento de la viabilidad celular. Solamente los polímeros C-581 y C-573 mantuvieron una capacidad de remoción a través de diferentes viabilidades. En cuanto a la remoción de proteínas contaminantes y ADN, los poli-L-aminoácidos mostraron ser los más efectivos.

La PEI destacó de los demás polímeros estudiados debido a que fue capaz de remover una alta cantidad de contenido celular del sobrenadante (>95%) y reducir los niveles de ADN a los límites permitidos. En lo que se refiere a la concentración de proteína del hospedero, la reducción en la concentración de este contaminante mediante el uso de este polielectrolito fue mínima, sin embargo este efecto pudiera verse aumentado con la adición de una mayor cantidad de floculante.

Se demostró que el uso de PEI puede afectar la recuperación primaria de EPO, reduciendo su concentración y sobre todo que la cantidad de proteína removida fue aquella que conforma las glicofomas activas biológicamente, constituidas por glicanos altamente sializados y por lo tanto con carga negativa. Se determinó que la vía de interacción entre EPO y el policatión es a través de los residuos de ácidos siálico. Esto fue corroborado por dispersión dinámica de luz empleando EPO a la cual le fueron removidos los ácidos siálicos. Por otra parte, se demostró que el uso de PEI no impacta en la recuperación de un anticuerpo monoclonal, dado que los niveles del AcMo son semejantes antes y después de la floculación y no se aprecian cambios en su patrón de glicosilación.

Aunque existen trabajos reportados en donde se ha utilizado polímeros para la recuperación de proteínas recombinantes de uso terapéutico (en específico anticuerpos monoclonales), estos se han centrado principalmente en el impacto del uso de estos floculantes sobre la concentración final del producto de interés. Este trabajo contribuye al conocimiento de esta operación de clarificación no solo en el término mencionado anteriormente sino también estableciendo la interacción que puede existir entre los polielectrolitos y ciertas glicofomas. Por lo tanto, se demostró que la floculación de células por medio de policationes puede modificar el tipo de

isoformas que se precipitan dependiendo de su patrón de glicosilación, específicamente favoreciendo la floculación de glicoproteínas con ácido siálico.

Por otra parte, también se documentaron los factores que propician la interacción entre la proteína y el polielectrolito, en este caso este tipo de unión fue por medio de la carga negativa de la proteína, la cual está dada en parte por la cantidad de residuos de ácidos siálicos que contiene. Este aporte permite evaluar sobre qué tipo de glicoproteína el uso de policationes pudiera tener un efecto.

Los resultados de este trabajo pueden ser de utilidad en la industria biofarmacéutica ya que establece un método de selección de glicofomas que en un caso en particular son deseadas y pudieran ser recuperadas, o en caso contrario retirarlas en etapas tempranas de la recuperación del producto.

9. PERSPECTIVAS

Con la realización del presente estudio, el conocimiento generado y las conclusiones que de ellas derivan, surgen diferentes propuestas que pueden ser aplicadas para mejorar la recuperación primaria de biofármacos por medio de polielectrolitos y estudiar otros eventos que esta operación implica. Algunas de estas investigaciones podrían ser:

Evaluar más condiciones de concentración de polielectrolito y diferentes pH en donde la carga del polielectrolito sea potenciada, para saber si esto puede ocasionar una mayor reducción de proteínas del hospedero, ADN y células en el sobrenadante, de manera que el proceso de clarificación sea más efectivo.

En cuanto a la recuperación de anticuerpos monoclonales se puede establecer un modelo de estudio en donde la molécula de interés sea un AcMo que en su patrón de glicosilación contenga glicanos sialidados (p. ej. Zenapax® y Herceptin®) y evaluar si estos pueden ser removidos por la acción de polielectrolitos. Dado que como se mencionó anteriormente este tipo de glicofomas puede disminuir la acción ADCC de los anticuerpos, tal operación resultaría en una mejora de la calidad del producto deseado. Por otra parte, también está documentado en la literatura (Harris, 2005) que debido a modificaciones postraduccionales incompletas existen formas "ácidas" de anticuerpos, las cuales pueden presentar puntos isoeléctricos menores a lo habitual y son consideradas como un contaminante importante del producto de interés. Al poseer una carga diferente, esta propiedad pudiera ser explotada para el diseño de un proceso de remoción por la acción de polielectrolitos.

En cuanto a la eritropoyetina, se puede evaluar la posibilidad de purificarla a partir de un medio clarificado mediante el uso de polielectrolitos en solución, evitando el uso de una columna cromatográfica. Por otra parte, se encuentra documentado que existen aplicaciones médicas para la asialoeritropoyetina asialidada (Higuchi, 2009), de modo que se podría evaluar un sistema completo de recuperación de esta glicoproteína utilizando polietilenimina.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn WS, Jeon J-J, Jeong Y-R, Lee SJ and Yoon SK. **2008**. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering* 101: 1234-1244.
- Akeprathumchai S, Han B, Wickramasinghe SR, Carlson JO, Czermak P, Preiß K. **2004**. Murine leukemia virus clearance by flocculation and microfiltration. *Biotechnology and Bioengineering* 88: 880–889.
- Apweiler R, Hermjakob H and Sharon N. **1999**. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473: 4-8.
- Atkinson A and Jack G. **1973**. Precipitation of nucleic acids with polyethyleneimine and the chromatography of nucleic acids and proteins on immobilised polyethyleneimine. *Biochimica et Biophys Acta* 308: 41-52.
- Aunins JG and Wang DIC. **1989**. Induced flocculation of animal cells in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 369.
- Baldi L, Muller N, Picasso S, Jacquet R, Girard P, Thanh HP, Derow E and Wurm FM. **2005**. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress* 21: 148-53.
- Barany S and Szepesszentgyfgyi A. **2004**. Flocculation of cellular suspension by polyelectrolytes. *Advances in Colloid and Interface Science* 111: 117-129.
- Belter PA, Cussler EE, Hu W-S. **1988**. *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*. New York: John Wiley & Sons 221-235.
- Bender J and Wokl B. **1998**. Putting a spin on CHO harvest: Centrifuge technology development. *ACS Meeting, Boston, MA*.
- Berthold W and Kempken R. **1994**. Interaction of cell culture with downstream purification: a case study. *Cytotechnology* 15: 229-242.
- Bonnerjea J, Jackson J, Hoare M and Dunnill P. **1988**. Affinity flocculation of yeast cell debris by carbohydrate-specific compounds. *Enzyme and Microbial Technology* 10: 357-360.
- Bradford MM. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248:252.
- Brooks SA. **2006**. Protein glycosylation in diverse cell systems: implication for modifications and analysis of recombinant proteins. *Expert Review of Proteomics* 3: 345:349.
- Brooks SA, Dwek MV and Schumacher U. **2002**. *Functional & Molecular Glycobiology*. BIOS Scientific Publishers, Padstow, UK. 354 p.

- Burton D and Woof JM. **1992**. Human antibody effector function. *Advances in Immunology* 1: 1-84.
- Butler M, Imamura T, Thomas J and Thilly WG. **1983**. High yields from microcarrier cultures by medium perfusion. *Journal of Cell Science* 61: 351-363.
- Butler M and Jenkins H. **1989**. Nutritional aspects of growth of animal cells in culture. *Journal of Biotechnology* 12, 97-110.
- Butler M. **2004**. Animal Cell Culture and Technology 2nd edition. *Bios Scientific, Oxford* 256 p.
- Byrne B, Donohoe GG and O'Kennedy R. **2007**. Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today* 12: 319-326.
- Capstick PB, Telling RC, Chapman WG and Stewart DL. **1962**. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot and mouth disease. *Nature* 195: 1163-1164.
- Carissiimi E and Rubio J. **2005**. The flocs generator reactor – FGR: a new basis for flocculation and solid-liquid separation. *International Journal of Mineral Processing* 75: 237-247.
- Carter PJ. **2006**. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology* 6: 343 –357.
- Chang TW. **2000**. The pharmacological basis of anti-IgE therapy. *Nature Biotechnology* 8: 157-163.
- Clark KM and Glatz CE. **1987**. Polymer dosage considerations in polyelectrolyte precipitation of protein. *Biotechnology Progress* 2: 241-247.
- Coffman J, Shpritzer R and Vicik S. **2006**. Flocculation of antibody producing mammalian cells with precipitating solutions of soluble cations and anions. *Recovery of Biological Products XII, Litchfield, AZ*.
- Cooper CL, Dubin PL, Kayitmazer AB and Turksen. **2005**. Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 10: 52-78.
- Cordes R, Sims WB and Glatz CE. **1990**. Precipitation of nucleic acids with poly(ethyleneimine). *Biotechnology Progress* 6: 283-328.
- Dasgupta S, Navarrete A-M, Bayry J, Delignat S, Wootla B, André S, Christophe O, Nascimbeni de M, Jacquemin M, Martinez-Pomares L, Geijtenbeek LBH, Moris A, Saint-Remy J-M, Kazatchkine MD, Kaveri SV and Lacroix-Desmazes S. **2007**. A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 8965:70.
- Davis JM and Arakawa T. **1987**. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 26: 2633-2638.
- Dimirov DS and Marks JD. **2008**. Therapeutic antibodies: Current state and future trends—is a paradigm change coming soon? *Methods in Molecular Biology* 525: 1-27.

- Dingermann T. **2008**. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Journal of Biotechnology* 3: 90–97.
- Dissing U, Mattiasson B. **1996**. Polyelectrolyte complexes as vehicles for affinity precipitation of proteins. *Journal of Biotechnology* 52: 1-10.
- Farid SS. **2006**. Established bioprocesses for producing antibodies as a basis for future planning. In: Hu W-S, Cell culture engineering. *Advances in biochemical engineering/biotechnology series*. Springer-Verlag, Berlin. 1-42 p.
- Fiore JV, Olson WP, Holst SL. **1980**. Depth filtration. In: Curling JM, Methods of Plasma Protein Fractionation. *Academic Press: New York*. 239-268 p.
- Freshney RI. **2005**. Culture of animal cells, a manual of basic technique. *Wiley-Liss, Oxford UK* 19-30 p.
- Galbraith DJ, Tait AS, Racher AJ, Birch JR, James DC. **2006**. Control of culture environment for improved polyethylenimine-mediated transient production of recombinant monoclonal antibodies by CHO cells. *Biotechnology Progress* 22: 753-762.
- Galili U, Anaraki F, Thall A, Hill-Black C and Radic M. **1993**. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood* 82: 2485–2493.
- GlycoBase NIBRT (<http://glycobase.ucd.ie/cgi-bin/public/glycobase.cgi>)
- Glyko Inc. **2001-2002**. Glycoconjugate analysis. In: Tools for glycobiology. *USA*, 2.2-2.42 p.
- Glynn J. **2008**. Process-scale precipitation of impurities in mammalian cell culture Broth. In: Shukla AA, Etzel MR and Gadam S. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. *Taylor and Francis Group, Boca Raton FL* 573 p.
- Gomord V, Sourrouille C, Fitchette AC, Bardor M, Pagny S, Lerouge P, Faye L. **2004**. Production and glycosylation of plant made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Journal of Plant Biotechnology* 2: 83–100.
- Goochee C, Gramer M, Andersen D, Bahr J and Rasmussen J. **1991**. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure. *Nature Biotechnology* 9: 1347-1355.
- Gramer MJ and Gooche C. **1993**. Glycosidase activities in chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnology Progress* 9:366-373.
- Guile G, Rudd P, Wing D and Dwek A. **1997**. HPLC strategies for profiling and sequencing oligosaccharides. In: Jackson P and Gallagher J. *BioMethods Vol. 9 A laboratory guide to glycoconjugate analysis*. Berlin 199-233 p.
- Haack A, Schmitt C, Poller W, Oldenburg J, Hanfland P, Brackmann HH and Schwaab R. **1999**. Analysis of expression kinetics and activity of a new B-domain truncated and full-length FVIII protein in three different cell lines. *Annals of Hematology* 78:111–116.
- Han B, Carlson JO, Powers SM and Wickramasinghe SR. **2002**. Enhanced Virus Removal by Flocculation and Microfiltration. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7: 6-9.

- Harris RJ. **2005**. Heterogeneity of recombinant antibodies: Linking structure to function. *Developments in Biologicals* 122:117–127.
- Herbert DN, Garman SC and Molinari M. **2005**. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagines-linked carbohydrates as protein maturation and quality control tags. *Trends in Cell Biology* 15:364-370.
- Higgins E. **2010**. Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic. *Glycoconjugate Journal* 27: 211-255.
- Higuichi M. 2009. Method for removing sialic acid and method for producing asialoerythropoietin. U.S. Patente No. 0005540 A1.
- Holland M, Takada K, Okumoto T, Takahashi N, Kato K, Adu D, Ben-Smith A, Harper L, Savage CO and Jefferis R. **2002**. Hypogalactosylation of serum IgG in patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Clinical and Experimental Immunology* 129:183–190.
- Hossler P, Khattak SF and Jian Li Z. **2009**. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 19: 936–949.
- Jacques de Ceaurriz FL. **2000**. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 405: 635.
- Jayapal KP, Wlaschin KF, Yap MGS, Hu W-S. **2007**. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress* 103: 40-47.
- Jefferis R. **2005**. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress* 21:11–16.
- Jefferis R. **2009**. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature Reviews in Drug Discovery* 8: 226-234.
- Jelkmann W. **1992**. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological Reviews* 72: 449–489.
- Jenkins N and Curling EMA. **1994**. Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 354-364.
- Jenkins N, Parekh RB and James DC. **1996**. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology* 14:975-961.
- Jones J, Krag S and Betenbaugh M. **2005**. Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochimica Biophysica Acta* 1726:121-37.
- Joosten CE and Shuler M. **2003**. Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells: role of glycosidases and effect of harvest time on glycosylation. *Biotechnology Progress* 19: 193-220.
- Imrem D, Gümüşderelioğlu M, Güner A. **2007**. Colon-specific delivery of IgG from highly swellable dextran hydrogels: in-vitro Study. *Hacettepe Journal of Biology & Chemistry* 3: 163-171.

- Kanda Y, Yamada T, Mori K, Okazaki A, Inoue M, Kitajima-Miyama K, Kuni-Kamochi R, Nakano R, Yano K, Kakita S, Shitara K and Satoh M. **2006**. Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* 17:104-118.
- Kaneko Y, Nimmerjahn F and Ravetch J. **2006**. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313:670-673.
- Kelley B. **2007**. Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations. *Biotechnology Progress* 23:995-1008.
- Kempken R, Preissmann A and Berthold W. **1994**. Assessment of a disc stack centrifuge for the use in mammalian cell separation. *Biotechnology and Bioengineering* 46: 132-138.
- Kibe T, Fujimoto S, Ishida C, Togari H, Okada S, Nakagawa H, Tsukamoto Y and Takahashi N. **1996**. Glycosylation and placental transport of IgG. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 21:57-63.
- Knight R and Ostreicher E. **1998**. Charge-modified filter media. In: Meltzer TH, Jornitz MW. Filtration in the Biopharmaceutical Industry. *Marcel Dekker: New York* 95-125 p.
- Köhler G and Milstein C. **1975**. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- Kretzmer G. **2002**. Industrial processes with animal cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:135-142.
- Kunkel JP, Jan DCH, Jamieson JC and Butler M. **1998**. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affect N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology* 62:55-71.
- Lee SJ, Kim S-B, Kim J-E, Kwon G-S, Yoon B-D and Oh H-M. **1998**. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus brauni*. *Letters in Applied Microbiology* 27: 14-18.
- Lund J, Takahashi N, Nakagawa H, Goodall M, Bentley T, Hindley S, Tyler R and Jefferis R. **1993**. Control of IgG/Fc glycosylation: a comparison of mouse subclass immunoglobulin Gs. *Molecular Immunology* 30:741-748.
- Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Nakagawa H and Jefferis R. **1995** Oligosaccharide-protein interactions in IgG can modulate recognition by Fc gamma receptors. *FASEB Journal* 9:115-119.
- Mahler SM, Leong S, Gilbert A, Yang F, Gray P, Van Dyk D and Roeth P. **2006**. Purification of monoclonal antibodies from cell culture supernatants by Gradiflow electrophoresis technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 445-453.
- Magoon K. **2010**. Global Monoclonal Antibodies Market Review 2010 (World Top Ten mAbs) Disponible en: <http://tinyurl.com/3xr9t9j>
- Maiese K, Chong ZZ, Hou J and Shang YC. **2008**. Erythropoietin and Oxidative Stress. *Current Neurovascular Research* 5: 125-142.

- Maiese K, Li F, Chong ZZ. **2005**. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 293:90–5.
- Malhotra JD and Kaufman RJ. **1995**. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Current Advances in Cell Developmental Biology* 18: 716-31.
- Marchant RJ, Al-Fageeh MB, Underhill MF, Racher AJ and Smales CM. **2007**. Metabolic rates, growth phase, and mRNA levels influence cell-specific antibody production levels from in vitro-cultured mammalian cells at sub-physiological temperatures. *Molecular Biotechnology* 39: 69-77.
- Masuda K, Yamaguchi Y, Kato K, Takahashi N, Shimada I and Arata Y. **2000**. Pairing of oligosaccharides in the Fc region of immunoglobulin G. *FEBS Lett* 473:349–357.
- McDonald P, Victa C, Carter-Franklin JN and Fahrner R. **2009**. Selective antibody precipitation using polyelectrolytes: A novel approach to the purification of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering* 102: 1141–1151.
- Merten OW. **2006**. Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. *Cytotechnology* 50: 1-7.
- Milburn P, Bonnerjea J, Hoare M and Dunnill P. **1990**. Selective flocculation of nucleic acids, lipids, and colloidal particles from a yeast cell homogenate by polyethyleneimine, and its scale-up. *Enzyme and Microbial Technology* 12: 527-532.
- Milgrom H, Fink J and Fowler-Taylor A. **2009**. Safety of omalizumab in children with inadequately controlled moderate-to-severe allergic (IgE-mediated) asthma. Poster presented at *American Thoracic Society (ATS) International Conference*, San Diego, California, USA.
- Mocini D, Leone T, Tubaro M, Santini M and Penco M. **2007**. Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in cardiovascular disease. *Current Medical Chemistry* 14:2278–87.
- Munzert E, Heidermann R, Büntemeyer H, Lehmann J and Müthing J. **1997**. Production of recombinant human antithrombin III on 20L bioreactor scale: correlation of supernatant neuraminidase activity, desialylation, and decrease of biological activity of recombinant glycoprotein. *Biotechnology and Bioengineering* 56:441–448.
- Nobbman U, Connah M, Fish B, Varley P, Gee C, Mulot S, Chen J, Zhou L, Lu Y, Sheng F, Yi J and Harding SE. **2007**. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 24: 117-128.
- O’Shannessy, D. J., Voorstad, P. J. & Quarles, R. H. **1987**. Quantitation of glycoproteins on electroblots using the biotin-streptavidin complex. *Analytical Biochemistry* 163: 204–209.
- Ozturk SS and Hu W-S. **2006**. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. *Taylor & Francis group, New York* 1-11 p.p
- Peram T, McDonald P, Carter-Franklin J and Fahrner R. **2010**. Monoclonal antibody purification using cationic polyelectrolytes: an alternative to column chromatography. *Biotechnology Progress* 26: 1322-1331.

- Palomares LA y Ramirez OT. **2007**. Glicosilación de proteínas recombinantes: Importancia y relación con las condiciones de bioproceso. En: Juaresti E. Diseño y producción de fármacos. *El Colegio Nacional* 95-123.
- Palomares LA, Joosten CE, Hughes PR, Granados RR and Shuler ML. **2003**. Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnology Progress* 19: 185-192.
- Palomares LA, Uribe JM, Delgado A, Hernández M, Servín P, Pérez J, Lecea L, Henández V, Cruz N, Ramírez OT. **2006**. The impact of the bioprocess on the glycosylation of recombinant human erythropoietin. *Cell Culture Engineering X*, Whistler, Canada.
- Parker DE, Glatz CE, Ford CF, Gendel SM, Suominen I and Rougvie MA. **1990**. Recovery of a charged-fusion protein from cell extracts by polyelectrolyte precipitation. *Biotechnology and Bioengineering* 36: 467-75.
- Pavlou A and Reichert J. **2004**. Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology* 22: 1513-1519.
- Pavlou AK and Belsey MJ. **2005**. The therapeutic antibodies market to 2008. *European Journal of Pharmaceutis and Biopharmaceutis* 59:389–396.
- Perkins M, Theiler R, Lunte S and Jeschke M. **2000**. Determination of the origin of charge heterogeneity in a murine monoclonal antibody. *Pharmaceutical Research* 17: 1110.
- Presta LG, Lahr SJ, Shields RL, Porter JP, Gorman CM, Fendly BM and Jardieu PM. **1993**. Humanization of an antibody directed against IgE. *Journal of Immunology* 151: 2623–2632.
- Raju TS, Briggs J, Borge S and Jones A. **2000**. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10:477-486
- Restelli V, Wang M-D, Huzel N, Ethier M, Perreault H and Butler M. **2006**. The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering* 94: 481-494.
- Ridley DM, Dawkins BS and Perlin E. **1994**. Erythropoietin: A Review. *Journal of the National Medical Association* 86: 129-135.
- Riley S. **2006**. The Future of Monoclonal Antibody Therapeutics: Innovation in antibody engineering, key growth strategies and forecast to 2011. Management London, UK. Report. *Business Insights Ltd* 180 p.
- Riske F, Schroeder J, Belliveau J, Kangb X, Kutzko J and Menona M. **2007**. The use of chitosan as a flocculant in mammalian cell culture dramatically improves clarification throughput without adversely impacting monoclonal antibody recovery. *Journal of Biotechnology* 128: 813–823.
- Roque ACA, Lowe CR and Taipa MA. **2004**. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. *Biotechnology and Bioengineering* 20: 639–654.
- Roush DJ and Lu Y. **2008**. Advances in Primary Recovery: Centrifugation and Membrane Technology. *Biotechnolgy Progress* 24: 488-495.

- Royle L, Dwek RA and Rudd PM. **2006**. Determining the structure of oligosaccharides N-and O-linked to glycoproteins. *Current Protocols in Protein Science Chapter Unit*: 12.6.
- Russell E, Wang A and Rathore AS. **2007**. Harvest of a therapeutic protein product from high cell density fermentation broths: principles and case study: In: Shukla AA, Etzel MR and Gadam S. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. *Taylor and Francis Group, Boca raton FL* 1-58.
- Russotti G and Goklen KE. **2001**. Crossflow membrane filtration of fermentation broth. In Wang WK: Membrane separations in biotechnology. *New York: Marcel Dekker*.
- Salt DE, Hay S, Thomas ORT, Hoare M and Dunnill P. **1995**. Selective flocculation of cellular contaminants from soluble proteins using polythileneime: A study of several organisms and polymer molecular weight. *Enzyme and Microbial Tecnology* 17: 107-113.
- Sarmay G. **1992**. Functional studies on Fc receptors. *Immunolgy Today* 13: 6-9.
- Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M. **1987**. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cADN. *Journal of Biological Chemistry* 262: 12059–12076.
- Satoh M, Shitara K and Hanai N. **2006**. The current stream and prospect of glycoscience application- Therapeutic Antibodies- Trends Glycoscience. *Glycotechnology* 18: 129-136.
- Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cal AN and Raju TS. **2007**. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular Immunolgy* 44:1524–1534.
- Seewoester T. **2006**. Cell separation and product capture. In: Ozturk SS, Hu W-S. *Taylor & Francis Group, New York* 417-431.
- Shan J-G, Xia J, Gui Y-X and Zhang X-Q. **1996**. Flocculation of cell, cell debris and soluble protein with methacryloyloxyethyl trimethylammonium chloride—acrylonitrile copolymer. *Journal of Biotechnology* 49: 173-178.
- Shaughnessy RJ, Byeseda JJ and Sylvester D. **1983**. Cationic polyelectrolyte flocculation of oil-water emulsion. Effects of mixing intensity and oil concentration. *Industrial and Engineering Chemistry Products Research and Development* 22: 473-470.
- Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA and Presta LG. **2002**. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal Biological Chemistry* 277: 26733-26740.
- Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N and Shitara K. **2003**. The absence of fucosa but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal Biological Chemistry* 278: 3466-3473.

- Shpritzer R, Vivik S, Orlando S, Acharya H and Coffman J. **2006**. Calcium phosphate flocculation of antibody-producing mammalian cells at pilot scale. 232nd *American Chemical Society National Meeting*, San Francisco, CA; BIOT division, Abstract 80
- Shukla AA, and Kandula JR. **2007**. Harvest and recovery of monoclonal antibodies: cell removal and clarification. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. *Taylor and Francis Group, Boca Raton FL* 573 p.
- Shukla AA, Etzel MR and Gadam S. **2007**. Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry. *Taylor and Francis Group, Boca Raton FL* 573 p.
- Singhvi R, Schorr C, O'Hara C, Xie L and Wang DIC. **1996**. Clarification of animal cell culture process fluids using depth microfiltration. *Biopharm* 9: 35-41.
- Spiro RG. **2002**. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and disease implications of glycopeptides bonds. *Glycobiology* 12: 43R-56R.
- Spivak JL. **2000**. Erythropoietin. Academic Press. Consultado en: <http://apress.gvpi.net/apcyto/lpext.dll?f=objects&fn=c09007.pdf>
- Stadlmann J, Pabst M, Kolarich D, Kunert R and Altmann F. **2008**. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics* 8: 2858-2871.
- Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H and Bailey JE. **1999**. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nature Biotechnology* 17:176–18.
- van den Nieuwenhof IM, Koistinen H, Easton RL, Koistinen R, Kamarainen M, Morris HR, van Die I, Seppala M, Dell A and Van den Eijnden DH. **2000**. Recombinant glycodelin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodelin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in Chinese hamster ovary cells. *European Journal of Biochemistry* 267: 4753–4762.
- van Reis R. **1991**. Industrial scale harvest of proteins from mammalian cell culture by tangential flow filtration. *Biotechnology and Bioengineering* 38: 413–422.
- Walsh G. **2009**. Post-translational modification in the context of therapeutic proteins: an introductory overview. In: Walsh G. Post-translational modification of protein biopharmaceuticals. *Wiley-Blackwell* 1-14 p.
- Walsh G. **2003**. Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology. *New York: John Wiley & Sons*. 686 p.
- Walsh G. and Jefferis R. **2006**. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol* 24: 1241-1252.
- Wang YF, Gao JY and Dubin PL. **1996**. Protein separation via polyelectrolyte coacervation: selectivity and efficiency. *Biotechnology Progress* 12: 356-362.
- Weiss P and Ashwell G. **1989**. The asialoglycoprotein receptor: Properties and modulation by ligand. *Progress in Clinical Biology Research* 300: 169-184.

- Wen YP and Dubin PL. **1997**. Potentiometric studies of the interaction of bovine serum albumin and poly(dimethyldiallylammonium chloride). *Macromolecules* 30: 7856-7861.
- Werner RG, Kopp K, Schlueter M. **2007**. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Foundation Acta Paediatrica* 96:17-22.
- Wickramasinghe SR, Han B, Carlson JO and Powers SM. **2004**. Clearance of minute virus of mice by flocculation and microfiltration. *Biotechnology and Bioengineering* 86: 612-621.
- Winkler C, Denker K, Wortelkamp S and Sickmann A. **2007**. Silver- and coomassie-staining protocols: Detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis* 28: 2095-2099.
- Wong VVT, Wong NSC, Tan H-K, Wang DIC, Yap MGS. **2002**. Enhancing production of recombinant proteins from mammalian cells. Molecular engineering of biological and chemical systems (MEBCS); <http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/3782>
- Woof JM and Burton DR. **2004**. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature Reviews in Immunology* 4:89-99.
- Wu TT, Kabat EA. **1970**. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *Journal of Experimental Medicine* 132: 211-250.
- Wurm FM. **2004**. Production of recombinant protein in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* 22: 1393-1398.
- Yan YD, Glover SM, Jameson GJ and Bi S. **2004**. The flocculation efficiency of polydisperse polymer flocculants. *International Journal of Mineral Processing* 73: 161- 175.
- Yang M and Butler M. **2002**. Effects of Ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnogyl Progress* 18: 129-138.
- Zhou Y and Franks GV. **2006**. Flocculation mechanism induced by cationic polymers investigated by light scattering. *Langmuir* 22: 6775-6786.

11. APÉNDICE A

• Poli-L-Ornitina

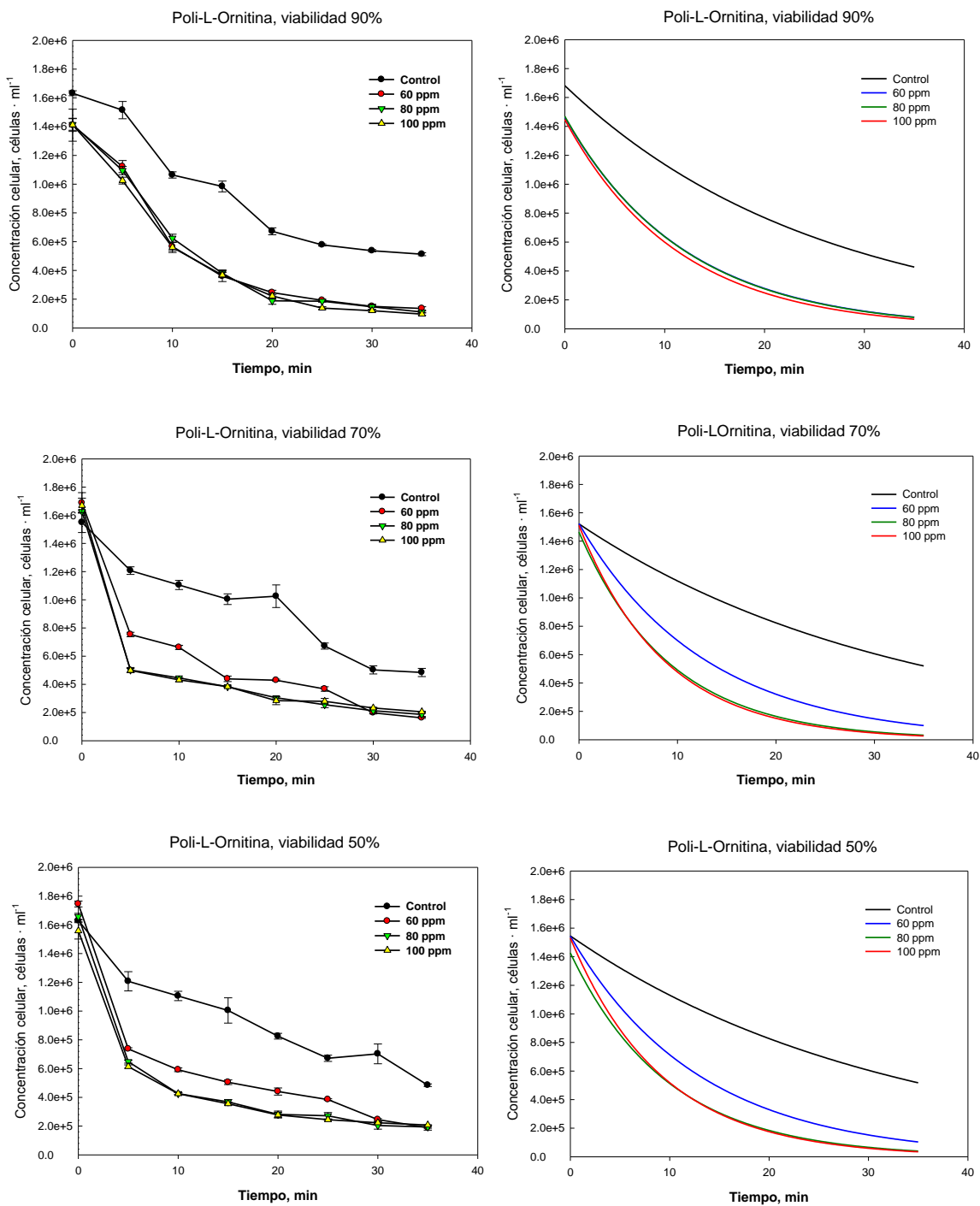


Figura 33. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-L-Ornitina.

• **Poli-L-Arginina**

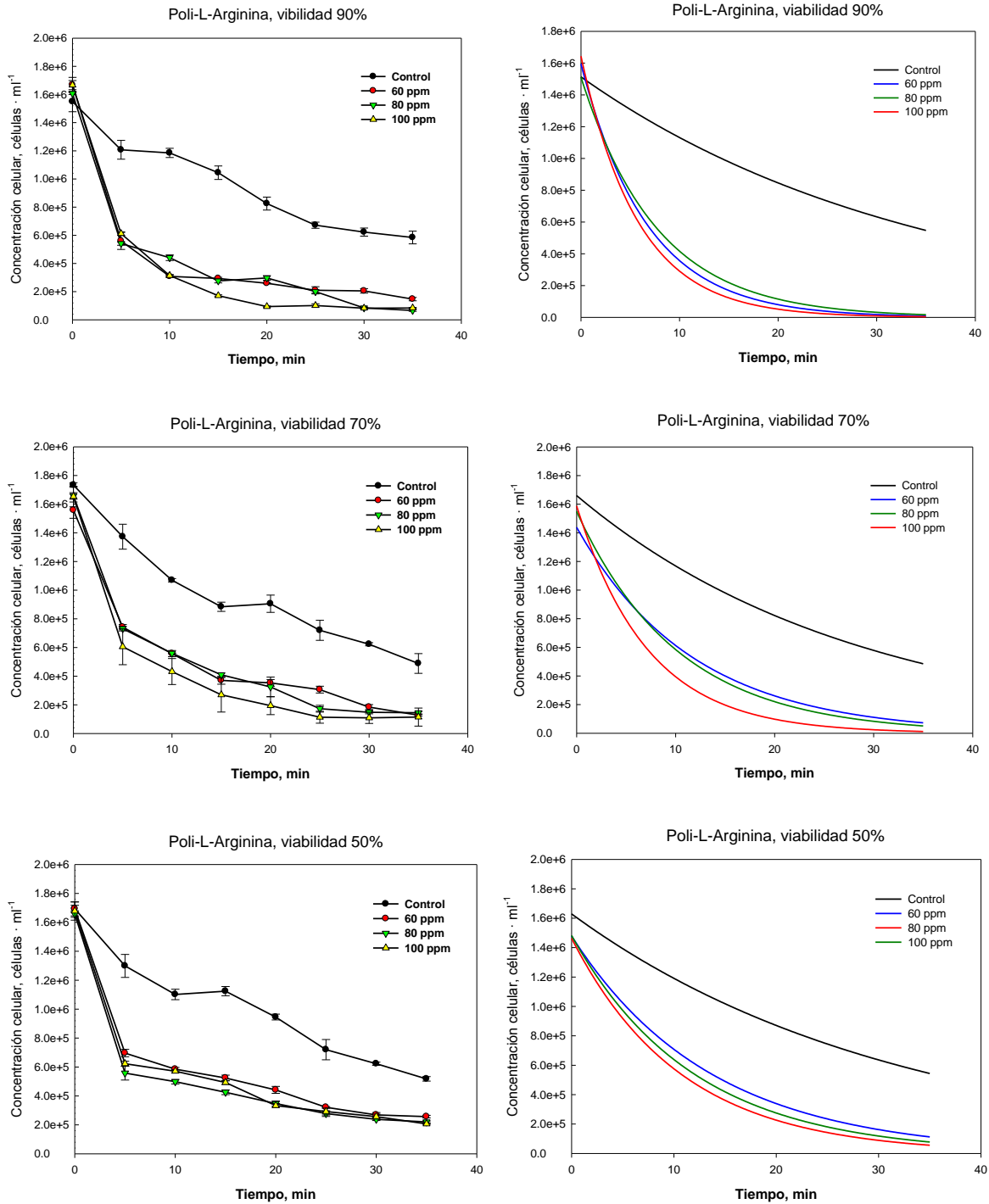


Figura 34. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-L-Arginina.

● **Poli-L-Histidina**

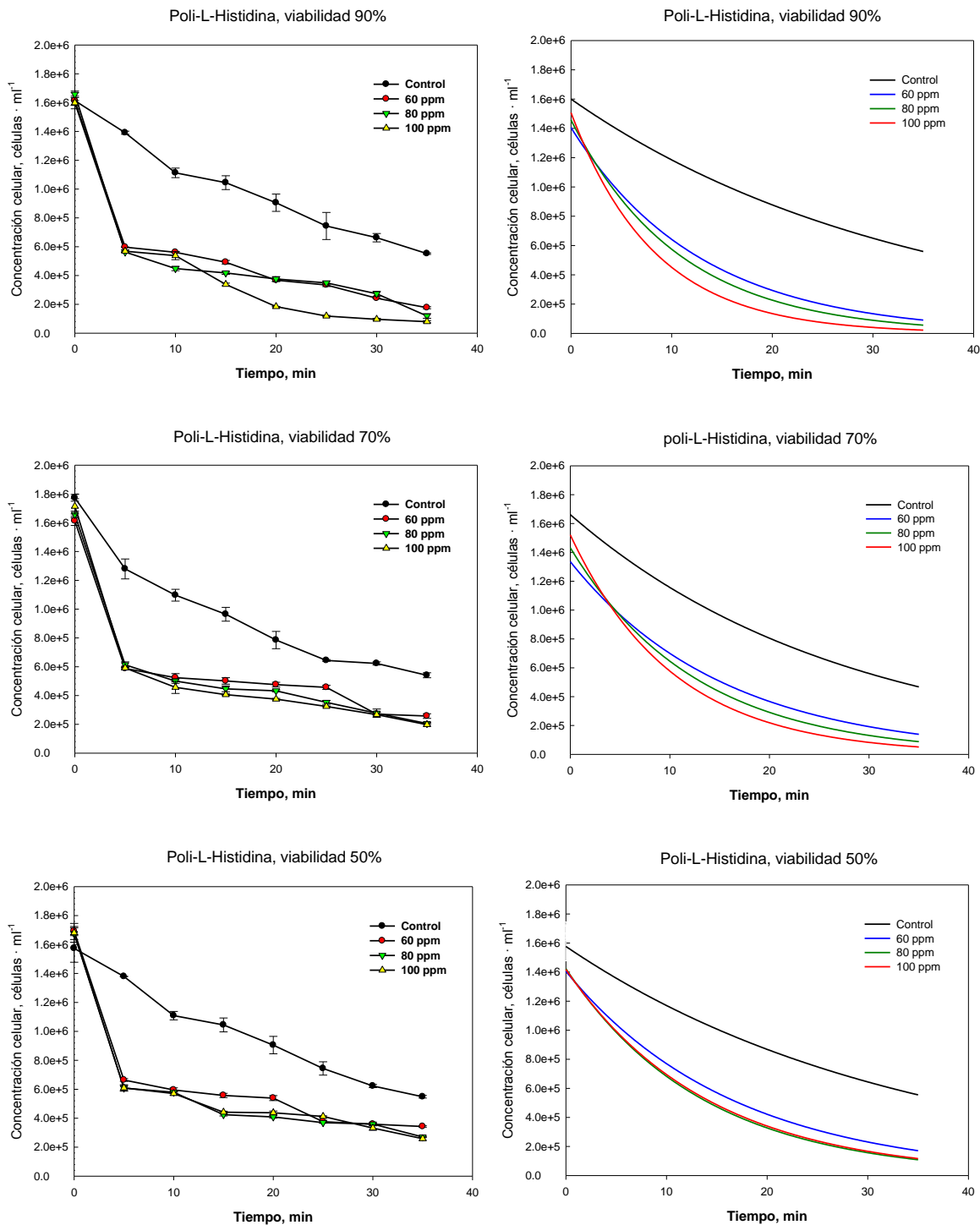


Figura 35. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-L-Histidina.

• Poli-Lisina DL

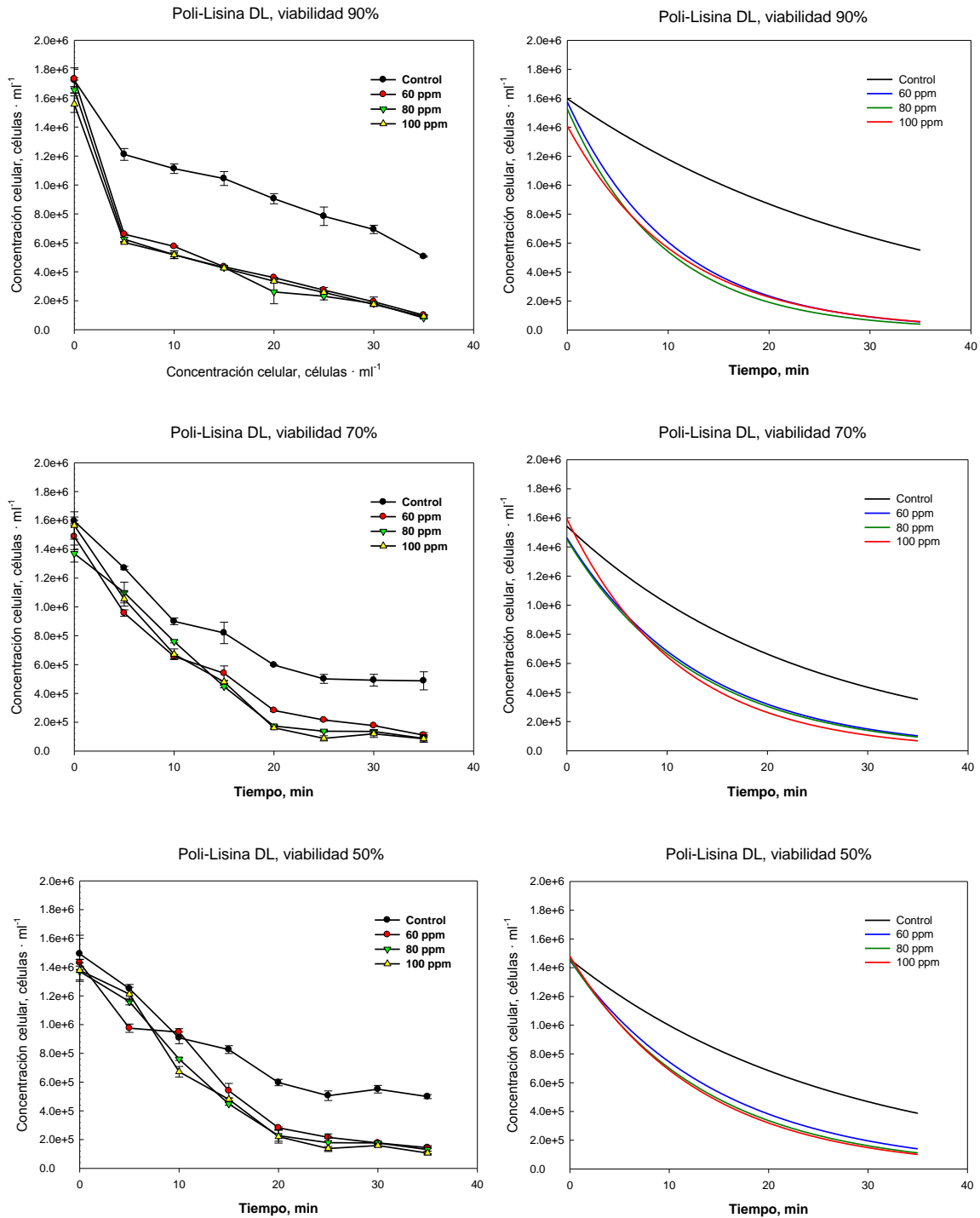


Figura 36. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-Lisina DL.

• **Poli-L-Lisina**

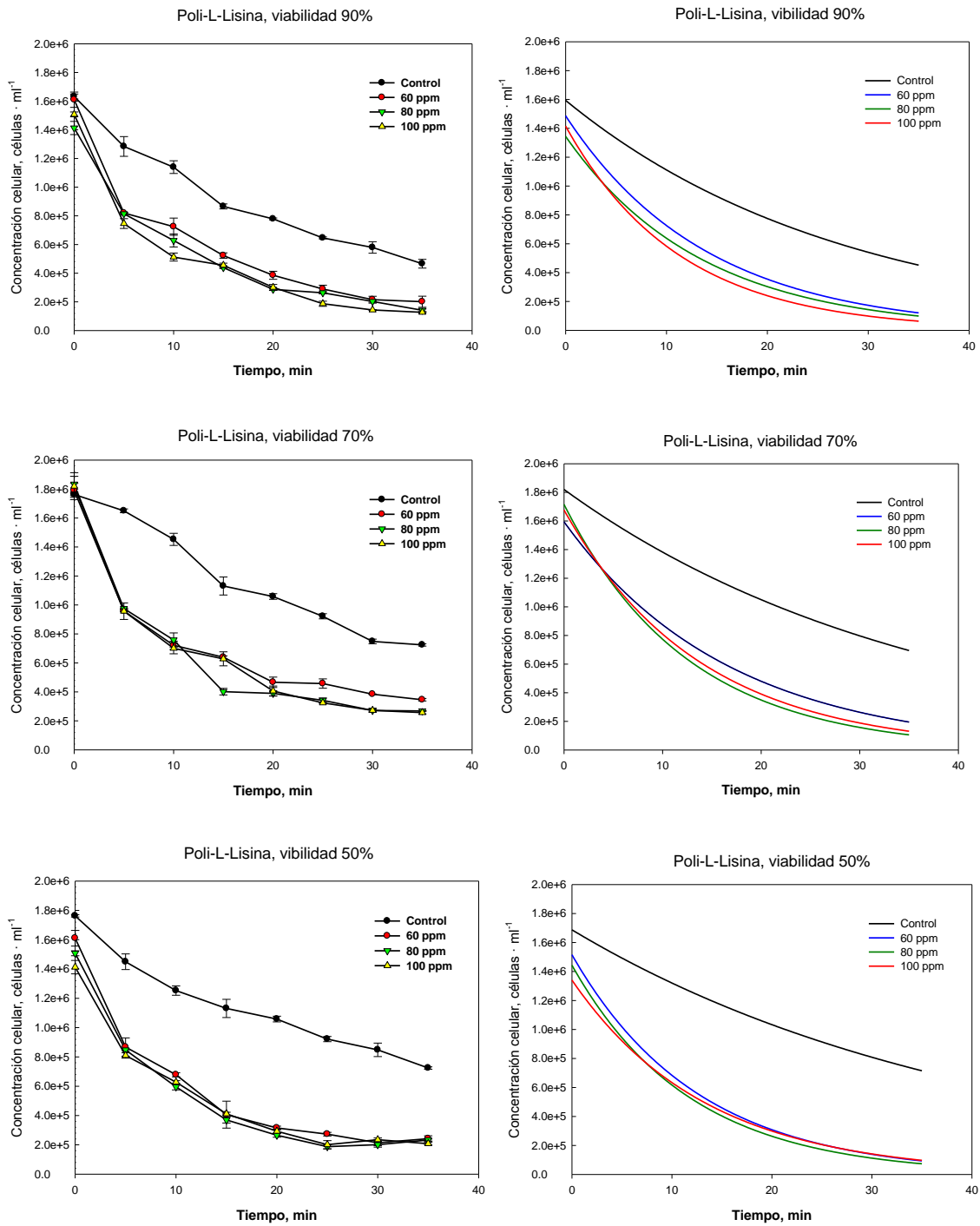


Figura 37. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Poli-Lisina.

• Polietilenimina

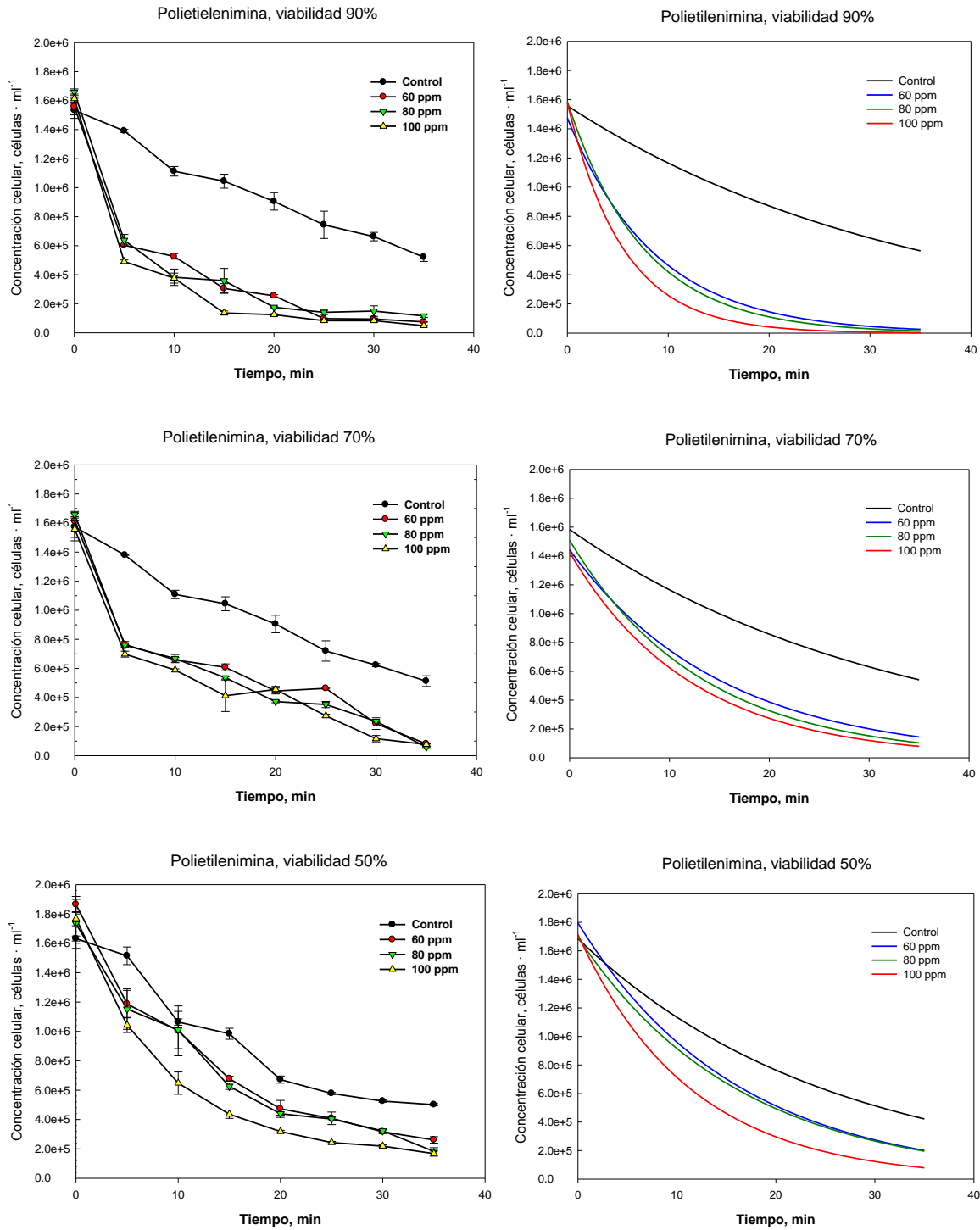


Figura 38. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Polietilenimina.

• **Kemira C-573**

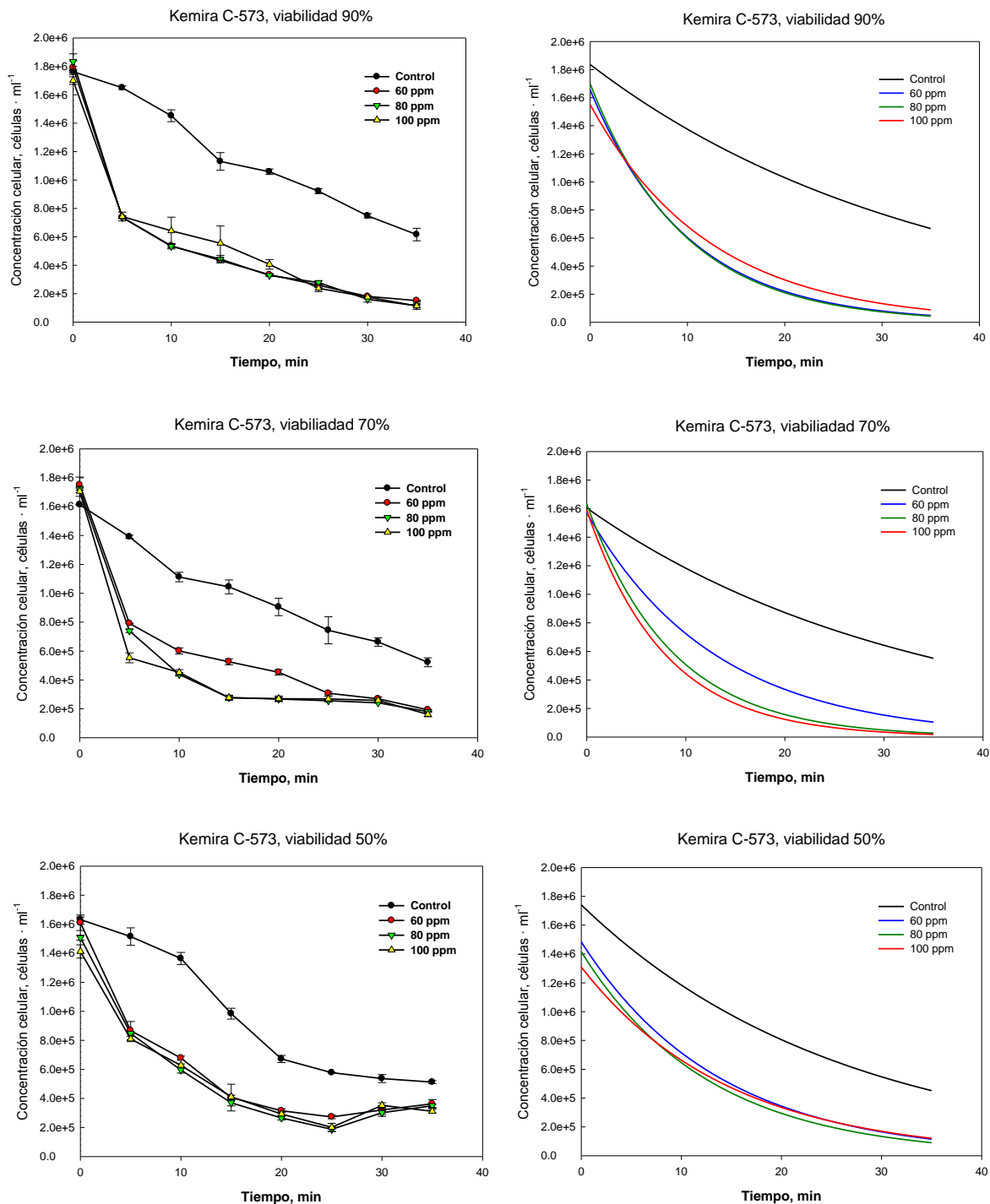


Figura 39. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Kemira C-573.

• **Kemira C-581**

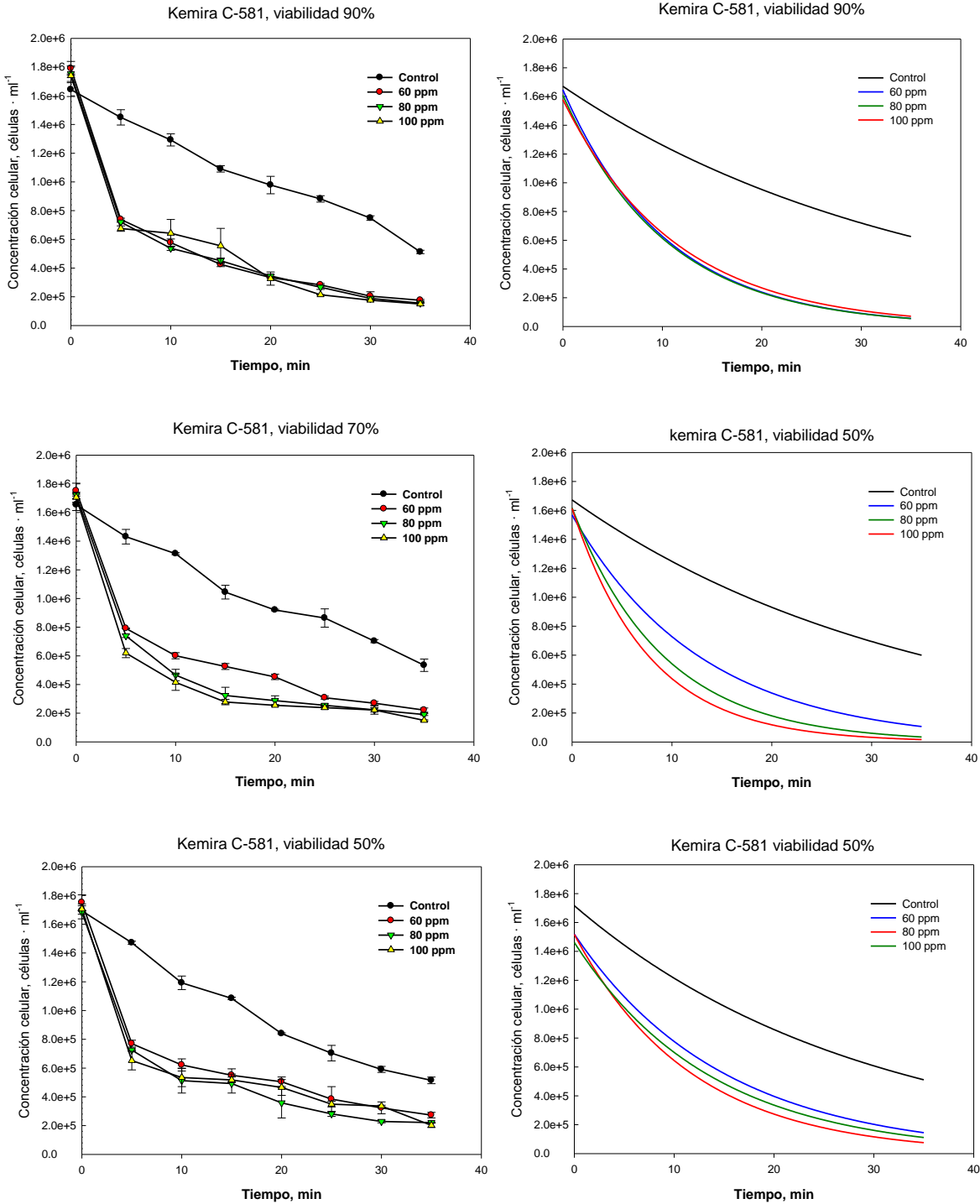


Figura 40. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Kemira C-581.

• **Tetraborato de sodio**

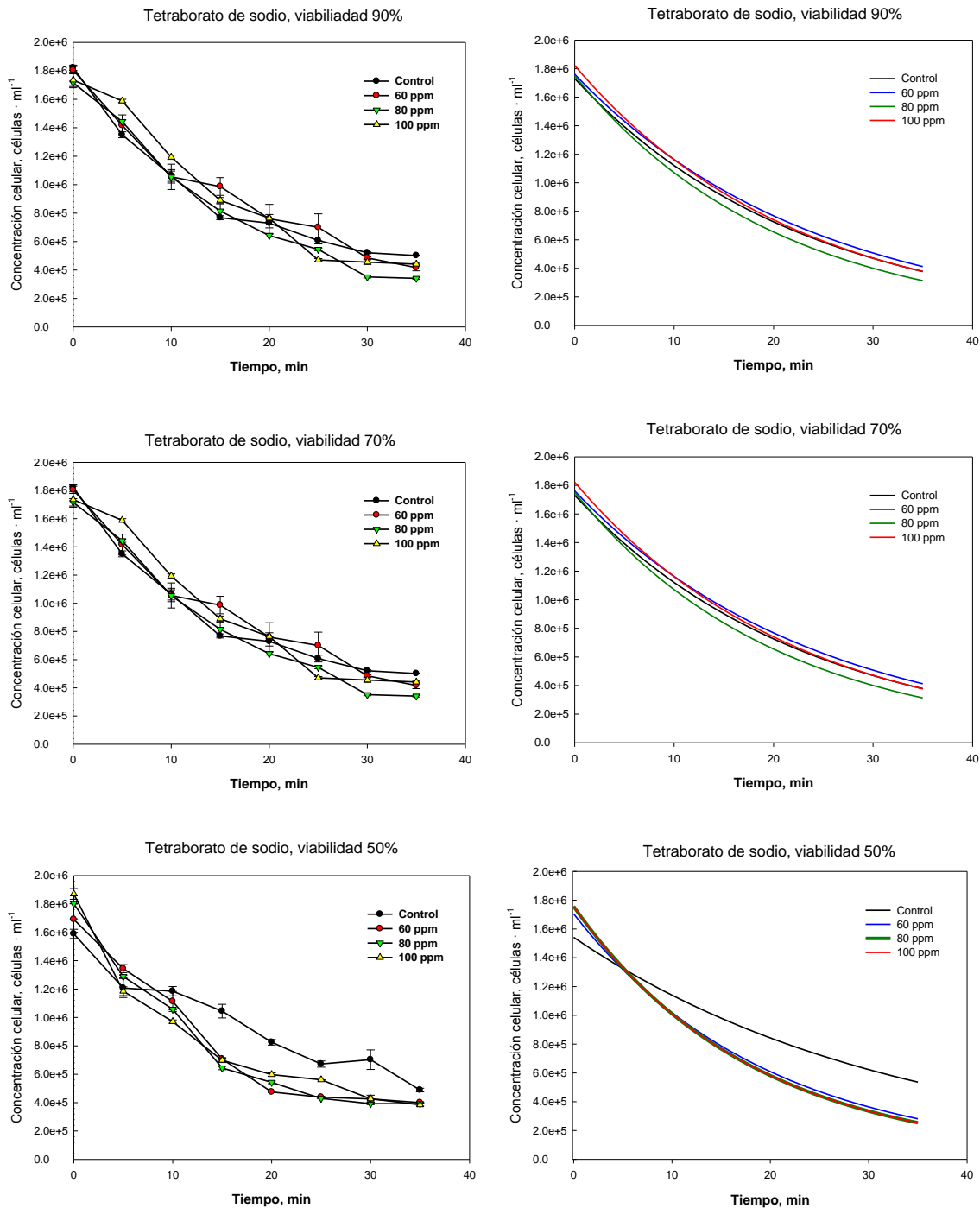


Figura 41. Cinéticas de sedimentación de células CHO con tetraborato de sodio.

• **Superfloc 90**

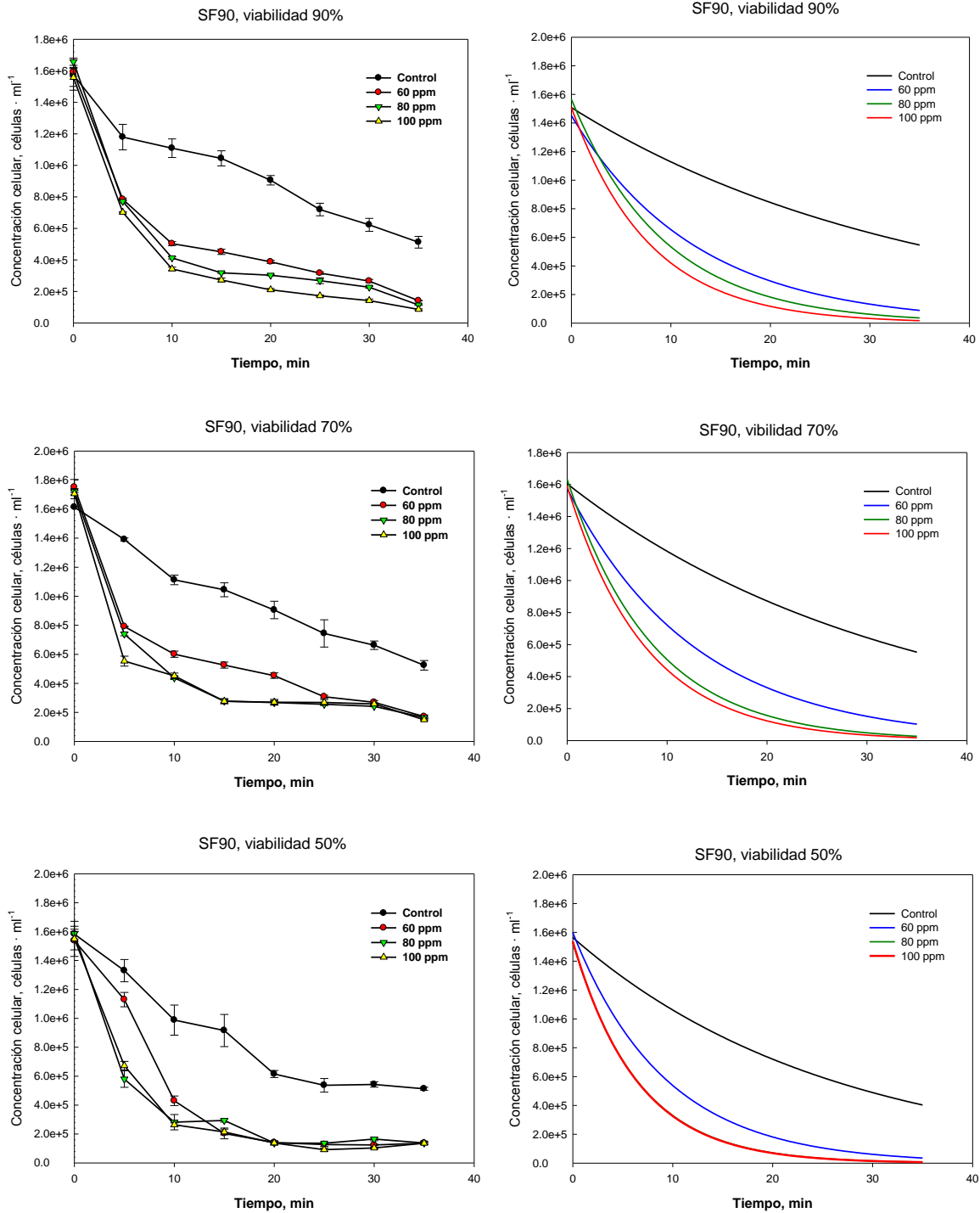
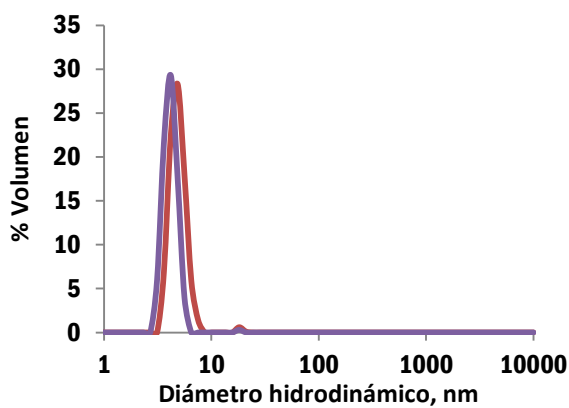
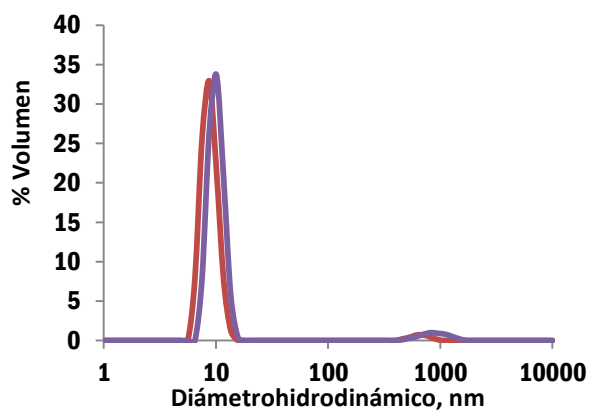


Figura 42. Cinéticas de sedimentación de células CHO con Superfloc 90.

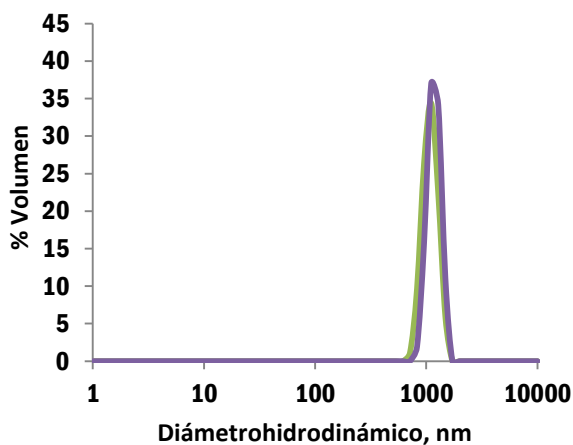
12. APÉNDICE B



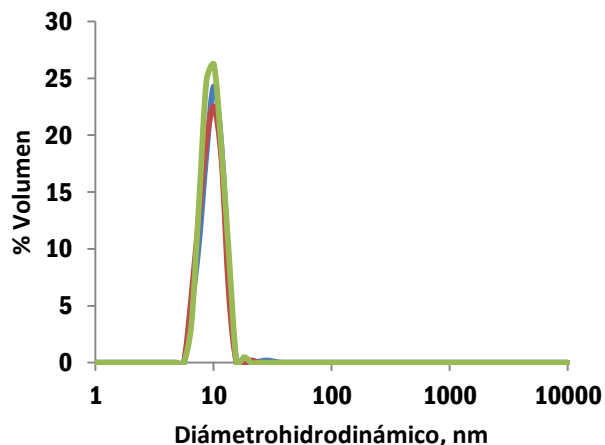
aEPO - PEI, pH 5



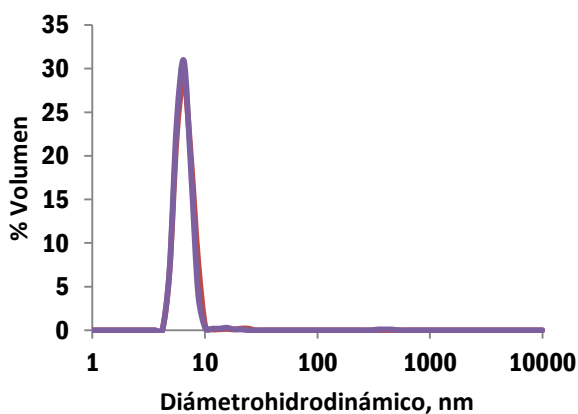
EPO - PEI, pH 5



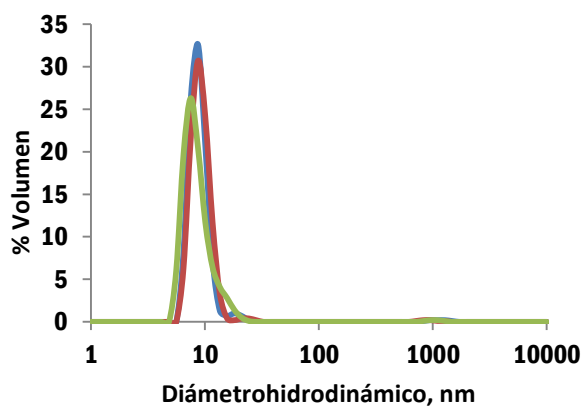
aEPO - PEI, pH 6.8



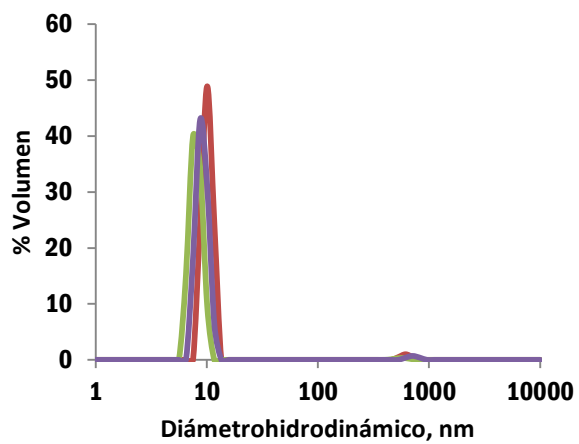
aEPO - PEI, pH 6.8



aEPO - PEI, pH 8



EPO - PEI, pH 8



Xolair – PEI, pH 6.8

Figura 43. Diámetros hidrodinámicos de interacción proteína-poliectrolito.