



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA LÍNEA CELULAR CHO DG44 ATCC PTA  
3356 Y AMPLIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL  
PRODUCIDO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**PRESENTA**

**MARÍA FERNANDA SÁNCHEZ GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Ortiz Jiménez Marco Antonio**

**VOCAL:**                 **Profesor: Páramo Ramírez José Ignacio**

**SECRETARIO:**         **Profesor: Serrato Pérez José Antonio**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Camacho de la Rosa Norma Angélica**

**2° SUPLENTE:**         **Profesor: Domínguez Valdez Verónica**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS**

**ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ ANTONIO SERRATO PÉREZ**

(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):**

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE (S): MARÍA FERNANDA SÁNCHEZ GARCÍA**

(nombre (s) y firma (s) )

## ÍNDICE GENERAL

I. Índice de tablas	II
II. Índice de figuras	II
III. Abreviaturas	III
1. Resumen	2
2. Introducción	4
3. Antecedentes	5
3.1. Generación de líneas celulares productoras de biofarmacéuticos	5
3.2. Línea celular CHO	5
3.3. Línea celular CHO DG44	6
3.4. Sistema Dehidrofolato Reductasa-Metotrexato (DHFR-MTX) para la selección de clonas de expresión constitutiva y amplificación del gen de interés	6
3.5. Amplificación	7
3.6. Estado del arte del sistema DHFR-MTX en células CHO DG44	8
3.7. Características del consumo y producción de metabolitos en líneas celulares productoras de biofarmacéuticos	10
3.8. N-glicosilación en anticuerpos recombinantes	11
4. Justificación	14
5. Hipótesis.	14
6. Objetivos	15

7. Materiales y métodos	16
7.1. Modelo biológico	16
7.2. Medio de cultivo	16
7.3. Mantenimiento celular	16
7.3.1. Congelación de células CHO DG44	16
7.3.2. Descongelación de células CHO DG44	17
7.3.3. Recambio de medio	17
7.4. Determinación de concentración y viabilidad celular	17
7.5. Adaptación de línea celular CHO DG44 PTA 3356 a medio químicamente definido	18
7.6. Caracterización cinética de la línea celular	18
7.7. Esquema de amplificación con MTX	18
7.8. Determinaciones analíticas	19
7.8.1. Cuantificación de Glucosa, Lactato y Glutamina	19
7.8.2. Cuantificación de AcMrh en cultivo celular	20
7.9. Purificación de Inmunoglobulina G Humana (IgGh)	21
7.10. Purificación de AcM recombinante humanizado	22
7.11. Determinación del perfil de N-glicosilación del AcMrh	23
7.12. Reactivos	25
8. Consideraciones matemáticas y estadísticas.	28
9. Nomenclatura de oligosacáridos	29

10. Resultados y Discusión	30
10.1. Caracterización cinética de la línea celular CHO DG44	30
10.2. Purificación de la inmunoglobulina G humana y el Anticuerpo Monoclonal recombinante humanizado	46
10.3. Ensayo inmuno-enzimático (ELISA)	48
10.4. Perfiles de N-glicosilación de la IgGh y el AcMrh	49
11. Conclusiones	55
12. Anexo I. Análisis estadístico	57
13. Referencias	69

## I. Índice de tablas

**Tabla 1.** Volumen necesario de solución Stock de MTX para cada condición de amplificación.

**Tabla 2.** Estructuras propuestas de acuerdo a las estructuras reportadas en GlycoBase en base a unidades de glucosa.

**Tabla 3.** Contenido de estructuras manosiladas, galactosiladas y fucosiladas encontradas en la IgGh y el AcMrh en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

## II. Índice de figuras

**Figura 1.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular CHO DG44 PTA 3356 sin estímulo con MTX.

**Figura 2.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 100 nM de MTX.

**Figura 3.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 200 nM de MTX.

**Figura 4.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 400 nM de MTX.

**Figura 5.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 800 nM de MTX.

**Figura 6.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 1600 nM de MTX.

**Figura 7.** Velocidad específica de crecimiento en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

**Figura 8.** Velocidad de consumo de glucosa, producción de lactato y rendimiento lactato/glucosa en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

**Figura 9.** Velocidad de producción de AcMrh en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

**Figura 10.** Cromatograma de purificación de IgG humana.

**Figura 11.** SDS-PAGE IgG humana.

**Figura 12.** Cromatograma de purificación AcMrh.

**Figura 13.** Comparativo SDS-PAGE de IgGh y AcMrh.

**Figura 14.** Determinación rango lineal de la prueba ELISA.

**Figura 15.** Curva estándar AcMrh e IgGh.

**Figura 16.** Cromatograma de glicosilación IgG humana purificada.

**Figura 17.** Perfiles de glicosilación de AcMrh en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

### III. ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcMrh	Anticuerpo Monoclonal recombinante humanizado
AcMrh <sub>Máx</sub>	Concentración máxima de anticuerpo recombinante humanizado
BSA	Albúmina de Suero Bovino
Cel/mL	Células por mililitro
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
DHFR	Dehidrofolato reductasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPO	Eritropoyetina
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
Gly-HCl	Buffer Glicina – ácido clorhídrico
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
h	Horas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Inmunoglobulina G tipo 1
IgGh	Inmunoglobulina G humana
KD	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mg/L	Miligramos por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
MTX	Metotrexato

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng/mL	Nanogramos por miliitro
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
°C	Grados celsius
PBS	Solución buffer de fosfatos
pg/cel/h	Picogramos por célula por hora
pmol	Picomol
pmol/cel/h	Picomol por célula por hora
pNPP/TRIS	Para-nitrofenil fosfato en buffer tris(hidroximetil) aminometano
qAcMrh	Velocidad de producción de anticuerpo monoclonal recombinante humanizado
qGlc	Velocidad de consumo de glucosa
qGln	Velocidad de consumo de glutamina.
qLac	Velocidad de producción de lactato
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
tPA	Factor plasminógeno tisular

Tris-HCl	Buffer tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorhídrico
vc	Volumen columna
VLA-1	Antígeno de activación muy tardía tipo 1
Xv	Concentración celular viable
YLac/Glc	Rendimiento lactato - glucosa
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro

## **1. RESUMEN**

La necesidad de cubrir la demanda del mercado por proteínas recombinantes de uso terapéutico ha impulsado a la industria biofarmacéutica a estudiar diferentes sistemas de amplificación génica y expresión de proteínas, entre los que destaca el sistema Dehidrofolato Reductasa-Metotrexato (DHFR-MTX). Este tipo de sistemas de amplificación génica además del aumento en la producción de proteínas recombinantes, puede inducir cambios en la fisiología y metabolismo de la línea celular que tengan un impacto negativo sobre la calidad de las proteínas.

En el presente trabajo se realizó la adaptación de la línea celular CHO DG44 PTA 3356 a medio químicamente definido (CD Opti CHO) y se realizó la caracterización cinética de crecimiento, consumo y producción de los metabolitos glucosa, glutamina y lactato en la línea celular en cultivos en frascos spinner a concentraciones de amplificación con Metotrexato (MTX) en un rango de 0 a 1600 nM. Así mismo, se determinó el perfil de producción del anticuerpo monoclonal recombinante humanizado (AcMrh) mediante la implementación de un inmunoensayo (ELISA) y se determinó el perfil de glicosilación del AcMrh producido por la línea celular en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

Se observó que la presión de selección y amplificación con MTX entre las condiciones de 0 y 800 nM de MTX tuvo un efecto negativo sobre la velocidad específica de crecimiento de la línea celular conforme se incrementó la concentración de MTX, es así que en el nivel de amplificación con 800 nM de MTX la velocidad de específica de crecimiento fue 1.5 veces menor que en los cultivos sin amplificar, sin embargo, a 1600 nM de MTX se observó una recuperación de la velocidad específica de crecimiento.

No se observaron cambios en los perfiles de consumo de glucosa y glutamina ni en la producción de lactato en las diferentes condiciones de amplificación con MTX, sin embargo, a 1600 nM de MTX hubo una disminución significativa del 45% en la velocidad de producción de lactato con respecto a los cultivos sin

Metotrexato.

A 200 nM de MTX se determinó una velocidad de producción de AcMrh de  $6.0 \pm 1.6$  pg/cel/h y se determinó una concentración máxima de AcMrh de 460 mg/L, esto quiere decir que la velocidad de producción de a 200 nM de MTX fue cerca de 6 veces mayor que lo obtenido a 0 nM MTX y la concentración máxima de AcMrh obtenida a 200 nM de MTX fue 7 veces mayor a la obtenida en los cultivos con 0 nM de MTX.

En cuanto a la glicosilación del AcMrh producido en los diferentes niveles de amplificación con MTX, se observó la presencia de estructuras altas en manosa y complejas biantenarias sin galactosas terminales, mono-galactosiladas y di-galactosiladas

Así mismo, en los niveles de 200 a 800 nM de MTX se observó un incremento promedio del 10% en las estructuras sin galactosas terminales en comparación con lo obtenido en los niveles de amplificación con 0 y 100 nM de MTX. También en los niveles de amplificación de 200 a 800 nM de MTX, se observó una disminución cercana al 50% en la proporción de estructuras di-galactosiladas en comparación con lo observado a 0 y 100 nM de MTX.

Basados en las unidades de glucosa y la Glycobase el perfil de N-glicosilación del AcMrh posee estructuras comparables a lo determinado en la IgGh, sin embargo el AcMrh posee mayor proporción de estructuras sin galactosas terminales (G0) así como de estructuras fucosiladas en comparación con lo obtenido en la IgGh. Así mismo, se observó que el perfil de glicosilación de la IgGh presenta estructuras multiantenarias y sialidadas no encontradas en el AcMrh producido por la línea celular.

## **2. INTRODUCCIÓN**

La industria biofarmacéutica ha empleado diferentes organismos como bacterias, células de insectos y/o de mamíferos para la producción de diferentes proteínas recombinantes de interés terapéutico (Bandaranayake & Almo, 2013). Aunque los sistemas bacterianos son ampliamente utilizados debido a la facilidad de manejo, bajo costo, rápidos ciclos de duplicación y alta productividad (>20 g/L), estos organismos no son capaces de hacer modificaciones post-traduccionales. En comparación, los sistemas de producción en células de mamíferos tienen la capacidad de hacer las modificaciones post-traduccionales necesarias para que el producto sea farmacológicamente activo y compatible con el ser humano, sin embargo, la productividad en estos sistemas celulares es baja (alrededor de 1g/L) (Agrawal & Bal, 2012; Jianwei, 2012).

La biotecnología y la industria farmacéutica han buscado el desarrollo de estrategias de cultivo y líneas celulares para la producción de diferentes biofármacos de interés. Entre las líneas celulares que han sido estudiadas para la producción de biofarmacéuticos se encuentran las células de riñón de hámster bebé (BHK, por sus siglas en inglés), células de riñón embrionario humano (HEK-293), células de hibridoma, células de mieloma de ratón (NS0), y las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) (Shen et al., 2006), estas últimas de gran interés ya que se han logrado adaptar a crecer en suspensión y en medios químicamente definidos. Así mismo, las células CHO han sido aceptadas para la producción de diferentes proteínas recombinantes desde la aprobación del factor activador de plasminógeno tisular (tPA) en 1986 (Noh et al., 2013).

Dado que el principal problema de los cultivos con células animales es la baja productividad (en comparación con los sistemas bacterianos y de levaduras), estas células requieren su modificación genética para incrementar la expresión y amplificación del gen de interés y con ello optimizar la producción de proteínas recombinantes.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. Generación de líneas celulares productoras de biofarmacéuticos.**

La generación de líneas celulares con alta productividad específica son indispensables para el escalamiento exitoso de un bioproceso y la producción de proteínas recombinantes a nivel industrial (Chusainow et al., 2009). Diferentes estudios han determinado que la velocidad específica de producción media de proteína es de alrededor de 50 pg/cel/día (De Jesús & Wurm, 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos por Brezinsky et al. (2003), dicha velocidad puede aumentar hasta 25 veces mediante la aplicación de estrategias de amplificación génica y selección clonal.

La generación de líneas celulares de mamífero productoras de proteínas recombinantes puede llevarse a cabo mediante dos diferentes sistemas de expresión. Estos sistemas se clasifican de acuerdo a la integración del gen de interés en la línea celular hospedera. La transfección es constitutiva, cuando el material genético es integrado al genoma del hospedero y por tanto heredado a las células hijas. La transfección es transitoria, cuando el material genético exógeno es adquirido y duplicado en unidades extracromosomales no heredables a las células hijas durante la mitosis. Entre las líneas celulares más empleadas para la generación de células productoras de proteínas recombinantes se encuentran las células CHO (Agrawal & Bal, 2012).

#### **3.2. Línea celular CHO**

Aisladas a finales de los años 1950`s por Theodore Puck, las células CHO han sido ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, debido a la nula o baja susceptibilidad a algunas infecciones virales humanas como VIH, influenza, poliovirus, herpes y paramixovirus (virus causante del sarampión) (Bandaranayake & Almo, 2013). Estas células son adaptables a medios de cultivo químicamente definidos, tienen la capacidad de crecer en biorreactores a gran densidad y presentan perfiles de glicosilación de proteínas similares al ser humano, lo que se relaciona con una mejor actividad farmacológica (Wacker et al., 2011; Jianwei,

2011; Cacciatore et al., 2010). Su genoma inestable permite la inserción de diferentes secuencias génicas relacionadas con la proteína de interés y su posterior amplificación, lo que se traduce en un incremento en la expresión de la proteína de interés (Cacciatore et al., 2010). Se estima que el 70 % de las proteínas recombinantes producidas actualmente son producidas en células CHO (Kim et al., 2012).

### **3.3. Línea celular CHO DG44**

La línea celular CHO DG44 fue generada por Urlaub & Chasin en 1980 a partir de la línea celular CHO-K1 mediante la exposición a rayos Gamma. Se caracteriza por tener deletados ambos alelos del gen Dehidrofolato Reductasa (DHFR) (este gen codifica para una enzima necesaria en la síntesis de ácidos nucleicos), esto las hace organismos auxótrofos a glicina, hipoxantina y timidina para su replicación y supervivencia a partir de la vía de salvamento de síntesis de DNA (Urlaub & Chasin, 1980).

### **3.4. Sistema Dehidrofolato Reductasa-Metotrexato (DHFR-MTX) para la selección de clones de expresión constitutiva y amplificación del gen de interés**

Fue desarrollado en la década de los 50`s en una investigación acerca de la resistencia a diferentes fármacos quimioterapéuticos en células cancerosas (Agrawal & Bal, 2012; Omasa, 2002). Se trata del sistema más ampliamente utilizado por la industria farmacéutica para la producción de proteínas recombinantes como eritropoyetina (EPO), factor activador de plasminógeno tisular y factor estimulador de granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) (Omasa, 2002).

Es un sistema de co-expresión y amplificación génica que requiere de células deficientes del gen DHFR, por ejemplo la línea celular CHO DG44, en donde se integrará el gen DHFR junto con el gen codificante para la proteína de interés en el genoma del hospedero.

El gen DHFR es utilizado como un marcador de selección para células que hayan integrado adecuadamente el material genético exógeno (que contiene el gen marcador y el gen codificante para la proteína de interés), por lo tanto estas células serán capaces de sobrevivir en medios de cultivo deficientes de hipoxantina-timidina, sintetizarán DNA por la vía tradicional y expresarán la proteína de interés.

La exposición y presión de amplificación a concentraciones crecientes de MTX (fármaco inhibidor de la enzima DHFR) dará como resultado la amplificación de ambos genes como un mecanismo de resistencia al fármaco.

### **3.5. Amplificación**

Está definida como “el incremento selectivo del número de copias de un gen codificante para una proteína específica sin un aumento proporcional en otros genes” (<http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=geneamplification>). Se trata de un proceso ampliamente desarrollado en diversos organismos mediante el cual se genera resistencia a diferentes estímulos esencialmente nocivos para la célula (Omasa, 2002).

El proceso de amplificación consta principalmente de dos pasos que son la introducción de un vector amplificable que contenga el gen marcador (generalmente en células deficientes de este gen, o con baja actividad del mismo) ligado a la secuencia del gen de interés para su co-amplificación; algunas veces seguido por la selección con un fármaco que ayude a identificar aquellas clonas transformadas. El segundo paso en el proceso es la amplificación misma; ya que la célula contiene una o dos copias del gen transfectado, este es selectivamente amplificado mediante la inducción por concentraciones crecientes de un fármaco dirigido contra el marcador. La exposición a concentraciones crecientes del fármaco permite que aquellas clonas que hayan amplificado eficientemente el gen marcador sobrevivan (Omasa, 2002; Shen et al., 2006).

En el caso del sistema DHFR-MTX aquellas células que adquirieron e integraron en su genoma el gen de interés junto al gen DHFR pueden ser entonces

sometidas a MTX con el fin de generar resistencia mediante la amplificación del gen DHFR, lo que da como resultado células con un mayor número de copias del gen codificante para la proteína de interés, aumento en la expresión y por lo tanto un aumento en la producción de la proteína recombinante de interés (Cacciatore et al., 2010). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la presión de selección con altas concentraciones de MTX en etapas tempranas, es decir, cuando las células poseen un bajo número de copias del gen marcador, da como resultado la prevalencia de otros mecanismos de resistencia al MTX (Chusainow et al., 2009).

### **3.6. Estado del arte del sistema DHFR-MTX en células CHO DG44**

El sistema DHFR-MTX es el sistema de amplificación génica más utilizado por la industria farmacéutica para la producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico (Omasa, 2002), por lo que se han realizado diferentes estudios con el fin de evaluar e identificar las mejores condiciones de amplificación y producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico.

Yoshikawa et al. (2000) observaron que la velocidad específica de crecimiento de clonas altamente productoras de factor estimulador de colonias de granulocitos depende del sitio de integración del gen en el DNA cromosomal, siendo los sitios de integración cercanos a los telómeros los que se relacionaron con una alta velocidad de crecimiento y producción de la proteína recombinante. Así mismo, durante el proceso de amplificación, las células sobrevivientes debido a rearrreglos cromosomales, pueden insertar el gen exógeno en sitios de transcripción eficiente como en la eucromatina altamente activa. También pueden aumentar el número de copias del gen de interés en un mismo sitio (amplificación en tándem) lo que eventualmente resulta en más producto (Chusainow et al. 2009).

Brezinsky et al. (2003) en un estudio dirigido a la selección de clonas hiperproductoras de anticuerpo monoclonal (AcM), probaron concentraciones de 25 a 250 nM de MTX, rango en donde las células fueron menos propensas a disminuir la velocidad de crecimiento pero pueden seguir incrementando su

productividad. Encontraron que las células sin amplificación con MTX tuvieron productividades cercanas a los 0.01 pg/cel/h. Las células en los primeros niveles de amplificación mostraron una velocidad específica de producción de 0.6 pg/cel/h y algunas clonas con los niveles más altos de amplificación (250 nM de MTX) mostraron velocidades específicas de producción cercanas a los 2 pg/cel/h.

Seung et al. (2005) probaron 5 niveles de amplificación con MTX en un rango de concentraciones de 5 a 1000 nM MTX. Encontraron que la velocidad específica de crecimiento disminuyó conforme se incrementó la concentración de MTX. Las clonas sin amplificar mostraron una velocidad de crecimiento de  $0.0279 \text{ h}^{-1}$ , mientras que en clonas amplificadas con 320 nM de MTX la velocidad específica de crecimiento fue de  $0.0125 \text{ h}^{-1}$ , es decir mostraron una disminución del 45% en la velocidad específica de crecimiento. Así mismo, encontraron que la variación clonal es un factor determinante en la producción de la proteína recombinante.

Jiang et al. (2006) probaron concentraciones de 50 - 3000 nM de MTX. Observaron una disminución en la velocidad específica de crecimiento y el aumento en la velocidad específica de producción de AcM en los diferentes niveles de amplificación con MTX. Además, observaron que en clonas presionadas a una concentración de 3000 nM de MTX la velocidad de producción específica de anticuerpo se mantiene constante durante la fase exponencial de cultivo y alcanza niveles de 2 a 3 pg/cel/h, mientras que las clonas sin amplificar mostraron una velocidad de producción de 0.4 pg/cel/h, sin embargo, al entrar el cultivo en fase estacionaria la productividad disminuyó bruscamente de un 30 a un 50 %. En cuanto a la velocidad específica de crecimiento observaron que las clonas en el nivel de amplificación más bajo (50 nM) mostraron una velocidad de  $0.0254 \text{ h}^{-1}$ , mientras que las clonas amplificadas a 3000 nM de MTX la velocidad específica de crecimiento fue de  $0.0208 \text{ h}^{-1}$ , es decir, hubo una disminución del 20% en la velocidad de crecimiento entre las dos condiciones de amplificación (50 y 3000 nM de MTX).

Chusainow et al. (2009) evaluaron concentraciones de 50 a 1000 nM de MTX, encontraron que a concentraciones de 500 nM de MTX las células mostraron

velocidades de producción específica de AcM superiores a 2 pg/cel/h y una velocidad específica de crecimiento de 0.012 h<sup>-1</sup>, mientras que la clona control mostró una velocidad específica de crecimiento de 0.017 h<sup>-1</sup>, es decir que la velocidad de crecimiento disminuyó un 30% a 500nM de MTX.

Cacciatore et al. (2012) evaluaron clonas cuya posición de amplificación génica estuviera en un sitio en el cromosoma que permitiera altas tasas de amplificación a diferentes concentraciones de MTX como son 10, 20, 100, 500, 5000 y 20000 nM. Encontraron que a 20000 nM de MTX algunas clonas pueden amplificar hasta 600 veces el número de copias del gen de interés, mientras que otras no amplifican el gen a pesar los altos niveles de resistencia al MTX debido a mecanismos alternativos de resistencia al MTX.

### **3.7. Características del consumo y producción de metabolitos en líneas celulares productoras de biofarmacéuticos**

Las líneas celulares han sido ampliamente usadas para la producción de proteínas recombinantes, por lo que la caracterización y entendimiento del metabolismo es necesario para el mejoramiento y optimización de la producción (Gódia & Cairó, 2006; Zagari et al., 2013).

El metabolismo en líneas celulares se caracteriza por el consumo ineficiente de las fuentes de carbono, nitrógeno y energía (glucosa y glutamina principalmente), por lo que se generan grandes cantidades de metabolitos de desecho como son lactato y amonio principalmente (Zagari et al., 2013). Se ha reportado que en líneas celulares la velocidad de consumo de glucosa y glutamina en cultivos es de 0.3 y 0.03 pmol/cel/h respectivamente (Gódia & Cairó, 2006).

Así mismo, se ha reportado que la acumulación de lactato en cultivos produce una disminución en el crecimiento celular debido a la disminución del pH y el incremento en la osmolaridad del medio. Lao & Toth (1997) evaluaron el efecto toxico del lactato a diferentes concentraciones sobre cultivos de células CHO, encontraron que a 20 mM de lactato hay un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular.

Tsao et al (2005) al evaluar el progreso de cultivos con células CHO a diferentes concentraciones de glucosa y lactato en el medio, encontraron que además de una relación directa entre el consumo de glucosa y la producción de lactato, puede haber consumo de lactato. Zagari et al (2013) proponen que el cambio en el consumo de glucosa por el consumo de lactato, además de obedecer a la composición del medio de cultivo y al metabolismo de la línea celular, la depleción de glutamina en etapas avanzadas de cultivo puede desencadenar el consumo de lactato. Dado que la glutaminólisis involucra la salida de malato de la mitocondria y su conversión a piruvato con la producción de NADPH, la deficiencia de glutamina provocará que las células consuman lactato para satisfacer la necesidad de NADPH, esto quiere decir que, la mitocondria juega un papel importante en la regulación del lactato en el medio, haciendo que este metabolito pueda ser introducido al ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

### **3.8. N-glicosilación en anticuerpos recombinantes**

La glicosilación es la modificación post-traducciona l más abundante y diversa (estructuralmente hablando) y por tanto es un parámetro de calidad minuciosamente regulado en la producción de proteínas recombinantes. (Albrecht et al. 2014).

Las glicoproteínas producidas en células de mamíferos tienen predominantemente estructuras N-glicosiladas multi-antenarias complejas que pueden estar fucosiladas y sialidadas (Albrecht, et al., 2014). La presencia o ausencia de estructuras específicas del oligosacárido, así como el número de ramas o antenas contribuye a la heterogeneidad de la proteína (Harcum, S., 2006); dicha heterogeneidad en muchos casos es determinante para la función efectora de una proteína terapéutica (Albrecht et al. 2014).

La glicosilación de una proteína puede modular su inmunogenicidad, eficacia terapéutica, solubilidad, estabilidad y farmacocinética (Hossler, et al. 2009; Wacker, et al., 2011; Albrecht, et al. 2014). La sialidación, por ejemplo, es

empleado como un parámetro de calidad, ya que determina la vida media de la proteína en el suero (Hossler, et al., 2009, Lipscomb, et al., 2005).

Como una estrategia para mejorar las propiedades terapéuticas de los anticuerpos recombinantes, se ha buscado que la manufactura de estos productos tengan una estructura definida y glicosilación similares a las inmunoglobulinas (Ig) humanas (Wacker, et al., 2011). Las Ig (inmunoglobulinas) de clase G (IgG) están compuestas predominantemente por N-glicanos bi-antenarios unidos al residuo de Asparagina 297 de la fracción CH2 de la cadena polipeptídica del anticuerpo, con heterogeneidad en la fucosilación, galactosilación y sialidación terminal del oligosacárido (Albrecht, et al. 2014) Así mismo, se ha relacionado la presencia de estos glicanos con la modulación de las funciones efectoras del anticuerpo (Barrios et al., 2015).

Wacker, et al. (2011) evaluaron la N-glicosilación en IgG humana policlonal y lo compararon con lo observado en diferentes anticuerpos recombinantes del mercado producidos por diferentes líneas celulares como las células CHO. Observaron que en humano el porcentaje de glicosilación de las formas biantenarias mono-galactosiladas (G1) y bi-galactosiladas (G2) se encuentran en proporciones similares entre el 20 y 30%, sin embargo, en los anticuerpos recombinantes la estructura biantenaria sin galactosas terminales (G0) esta significativamente elevado en la mayoría de los anticuerpos probados además observaron que las estructuras G1(1,3) y G2 mostraron bajos niveles en comparación con el humano. Interesantemente la estructura de oligosacárido G1(1,6) mostró niveles comparables a lo encontrado en IgG humano.

Se ha determinado que la proporción de las formas a-galactosiladas (G0), mono-galactosiladas (G1) y bi-galactosiladas (G2) se puede modificar dependiendo de las condiciones medioambientales de cultivo o por la composición del medio (Hossler, et al., 2009; Albrecht, et al., 2014).

Lipscomb et al. (2005) evaluaron las diferencias en la producción y los patrones de glicosilación de la proteína reportera alcalina fosfatasa secretada (SEAP, por sus

siglas en inglés) al ser producida bajo diferentes estrategias de cultivo (cultivo en lote alimentado y cultivo en perfusión) así como los efectos de la amplificación con MTX a concentraciones de 10 a 1000 nM. Encontraron que mediante la estrategia de amplificación con DHFR-MTX a 1000 nM de MTX se logró aumentar hasta 10 veces la producción máxima de proteína al igual que la productividad específica. La velocidad específica de crecimiento en las clonas amplificadas a 1000 nM fue dos veces menor que las clonas no amplificadas y la concentración celular viable máxima alcanzada fue también menor. No encontraron diferencias significativas en la proporción de formas no sializadas, completamente sializadas, parcialmente sializadas entre las clonas amplificadas y sin amplificar, aunque, si observaron un aumento significativo de especies tri-antenarias y tetra-antenarias no sializadas en las clonas amplificadas a 1000 nM de MTX.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El estudio del efecto de la amplificación génica con MTX sobre el crecimiento y metabolismo de células CHO-DG44 así como sobre la producción y perfil de glicosilación del AcMrh producido, contribuye a un mejor entendimiento del sistema de expresión y amplificación génica DHFR-MTX para la optimización de la producción de proteínas recombinantes.

#### **5. HIPÓTESIS**

El estrés generado por la exposición a concentraciones crecientes de MTX además de inducir el aumento de la expresión de la proteína recombinante de interés, afectara el crecimiento, consumo y producción de metabolitos y el patrón de glicosilación del AcMrh producido.

## **6. OBJETIVOS**

- **Objetivo general**

- Caracterizar el perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos, producción de AcMrh y evaluación del perfil de glicosilación del AcMrh producido por la línea celular CHO DG44 ATCC PTA 3356 durante la amplificación de la expresión del anticuerpo monoclonal recombinante, mediante el incremento secuencial de la concentración de MTX.

- **Objetivos particulares**

- Adaptar la línea celular CHO DG44 ATCC PTA 3356 a medio químicamente definido.
- Determinar el comportamiento cinético y metabólico de la línea celular con presión de selección a diferentes concentraciones de MTX (100 – 1600 nM)
- Implementar una técnica de inmuno-ensayo (ELISA) para la cuantificación del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular CHO DG44 PTA 3356.
- Purificar el AcMrh producido.
- Determinar el patrón de glicosilación del AcMrh producido en las diferentes condiciones de amplificación con MTX.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. Modelo biológico**

Línea celular CHO DG44 ATCC PTA 3356 productora de anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado (patente No. US 7,358,054 B2) dirigido contra la integrina VLA-1, proteína relacionada en diversas condiciones inmunológicas e inflamatorias.

### **7.2. Medio de cultivo**

Medio CD Opti CHO (Gibco, Life Technologies No. Cat. 12681-011) suplementado con 8 mM de L-Glutamina y antibiótico-antimicótico 1X (Gibco, Life Technologies No. Cat. 15240-062).

### **7.3. Mantenimiento celular**

#### **7.3.1. Congelación de células CHO DG44**

Se realizaron los cálculos necesarios para que al final del proceso cada criovial contara con un mínimo de 5 millones de células por mililitro.

Cultivos en etapa exponencial se centrifugaron en tubos cónicos a 800 rpm durante 10 min. El concentrado celular fue resuspendido en medio de criopreservación constituido por 45% medio acondicionado, es decir el sobrenadante del cultivo celular, 45% de medio fresco (suplementado con Glutamina a 8mM y antibiótico) y 10 % de DMSO (Dimetil sulfóxido) como agente crioconservador.

Se realizaron alícuotas de 1 mL en crioviales previamente etiquetados, estos fueron colocados a -30°C para su congelación (>2h), a -70°C (1 - 7 días) y finalmente colocadas en N<sub>2</sub> líquido para su conservación.

Este proceso se repitió para cada fase de adaptación con MTX.

### **7.3.2. Descongelación de células CHO DG44**

En un tubo cónico se colocaron 5 mL de medio fresco y el contenido de 1 criovial descongelado. El tubo fue centrifugado a 800 rpm por 10 min con el fin de eliminar el DMSO. El concentrado celular fue resuspendido en medio fresco y colocado en un frasco T75 con medio fresco e incubado a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se realizó un conteo celular aproximadamente 2 h después de la descongelación para evaluar la calidad de las células recién descongeladas.

### **7.3.3. Recambio de medio**

Se realizó un recambio de medio cada 3-4 días con base a comportamiento de las células (crecimiento y viabilidad).

Se tomó el volumen de cultivo necesario para obtener un inóculo de  $0.2-0.25 \times 10^6$  cel/mL, el medio fue colocado en tubo cónico y centrifugado a 800 rpm durante 10 min. El concentrado celular fue resuspendido en medio fresco suplementado a 37°C.

### **7.4. Determinación de la concentración y viabilidad celular**

Se realizaron diluciones con el colorante por exclusión azul Tripano. Se colocaron 20 µL en cámara de Neubauer y finalmente se realizaron conteos de células viables y células muertas a microscopio con objetivo de 10x.

La técnica de exclusión de colorante permite diferenciar entre células vivas y muertas con base a la integridad de la membrana celular, es decir, las células vivas no permitirán la entrada del azul de Tripano y se mostrarán refringentes, sin embargo, aquellas células cuya integridad de membrana haya sido comprometida serán permeables al azul Tripano y tomarán la coloración azul (células muertas).

## **7.5. Adaptación de línea celular CHO DG44 PTA 3356 a medio químicamente definido**

A partir de un banco celular maestro de la línea celular CHO DG44 ATCC PTA 3356 con 5% de SFB, se descongeló y mantuvo en medio químicamente definido CD Opti CHO suplementado con 8 mM de L-Glutamina y antibiótico-antimicótico hasta alcanzar viabilidad superior al 90%.

## **7.6. Caracterización cinética de la línea celular**

Se realizaron cinéticas de crecimiento por triplicado en frascos spinner de 20 mL. Para el inóculo se tomó un volumen de medio con células suficiente para obtener una concentración inicial de  $0.2 \times 10^6$  cel/mL en 60 mL. Dicho volumen de medio con células fue centrifugado a 800 rpm durante 10 min; el concentrado celular fue resuspendido y llevado a volumen con medio fresco a 37°C en un frasco T75, posteriormente se homogenizó cuidadosamente y fue dispensado a 3 frascos spinner de 20 mL cada uno. Finalmente, los spinner fueron colocados en incubación a 37°C, 5 %CO<sub>2</sub> y agitación constante de 120 rpm.

Se tomaron muestras de 400 µL cada 24 h para conteo celular, determinación de metabolitos (glutamina, glucosa y lactato) y ELISA hasta que el cultivo estuviese en etapa de muerte.

Se realizaron cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos así como de producción de AcMrh para cada condición de amplificación con MTX.

## **7.7. Esquema de amplificación con MTX**

Una vez adaptada la línea celular a medio sin SFB, se inició el esquema de amplificación mediante el sistema DHFR-MTX, para lo cual se preparó una solución Stock de MTX a 968.22 µM en medio fresco.

A partir de la solución Stock se tomó el volumen necesario para obtener la concentración requerida de MTX de acuerdo a la **Tabla 1**.

Se colocaron inóculos de  $0.4 \times 10^6$  cel/mL en frascos T de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, con medio acondicionado y medio fresco a la concentración requerida de MTX. Se realizó recambio de medio cada 3-4 días de acuerdo a las necesidades del cultivo.

**Tabla 1.** Volumen necesario de solución Stock de MTX, para cada condición de amplificación.

Concentración deseada de MTX (nM)	Volumen necesario de solución Stock por cada 100 mL de medio (μL)
100	10.3
200	20.7
400	41.3
800	82.6
1600	165.3

La línea se consideró adaptada al alcanzar una viabilidad  $\geq 90\%$ .

## 7.8. Determinaciones analíticas

### 7.8.1. Cuantificación de Glucosa, Lactato y Glutamina

Se clarificaron las muestras obtenidas durante la cinética mediante centrifugación a una velocidad 6000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron colocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su conservación. La cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo mediante equipo multianalizador bioquímico YSI-2700 y 2900.

En el equipo se lleva a cabo una reacción enzimática específica para cada metabolito, ya que contiene enzimas específicas para el analito de interés, inmovilizadas entre 2 membranas de policarbonato y acetato de celulosa respectivamente. En la primera membrana el analito será oxidado por la enzima; esta reacción produce peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que pasara a través de la membrana de celulosa hacia un electrodo de platino donde se oxida y produce una corriente proporcional a la concentración del analito.

### **7.8.2. Cuantificación de AcMrh en cultivo celular.**

Para la cuantificación del AcMrh producido en cultivo durante la cinética, se implemento un inmunoensayo (ELISA) tipo sandwich en placas de 96 pozos (Nunc-Inmuno Modules, maxisorp No Cat. 469949)

Se colocaron 100  $\mu$ L de anticuerpo (Ac) primario (Rabbit anti-Human IgG, polyclonal, GTX 77537) a una dilución de 1:2000 en PBS, de acuerdo a recomendación del fabricante y se dejo incubar toda la noche a 4°C.

Se realizaron 3 lavados con 125  $\mu$ L de la solución de lavado Tween 20/PBS a 0.05% y posteriormente se bloquearon los sitios activos remanentes con 100  $\mu$ L de una solución de 10 mg/mL de BSA, se incubo la placa 2 h a temperatura ambiente.

Se repitió el esquema de lavado y se colocaron 100  $\mu$ L de una dilución pertinente de los sobrenadantes obtenidos durante los cultivos. Se colocó PBS en pozos blanco.

Se determinó el rango lineal de la prueba de ELISA mediante diluciones seriadas de anticuerpo IgG humano purificado. Una vez determinado el rango lineal se realizaron 4 diluciones seriadas del anticuerpo humano y humanizado purificados por cromatografía de afinidad con proteína G. Se colocaron 100  $\mu$ L por sextuplicado de cada dilución.

Se dejo incubar las placas durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente, las placas fueron lavadas y se les colocó 100  $\mu$ L de Ac secundario (AP conjugated Goat anti-Human, polyclonal. GTX 26859) a una dilución de 1:1000 en PBS. Se dejo incubar 2 h a temperatura ambiente.

Se repitió el esquema de lavado y se añadieron 200  $\mu$ L de solución reveladora pNPP/Tris (tabletas SIGMA FAST P-Nitrophenyl Phosphate No. Cat. N2770) a cada pozo. Se colocó en incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 min con el fin de revelar la actividad enzimática que se percibe por la coloración amarilla. Se detuvo la reacción enzimática con 50  $\mu$ L de una solución NaOH 3M.

Finalmente se realizó la lectura colorimétrica a 415 nm en equipo lector de placa (BioRad microplate reader).

### **7.9. Purificación de Inmunoglobulina G Humana (IgGh)**

Con el fin de tener un estándar de anticuerpo humano, se purificó IgG humana a partir de suero obtenido de sangre periférica mediante precipitación selectiva con 50% de una solución saturada de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), y cromatografía de afinidad con proteína G.

Se obtuvieron 1.6 mL de suero a partir de sangre venosa, se adicionaron lentamente 800  $\mu\text{L}$  de una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , con el fin de precipitar proteínas (inmunoglobulinas IgG principalmente) y se colocó en agitación constante durante 1 h. La suspensión obtenida fue centrifugada a 10000 rpm durante 20 min. El precipitado de proteína fue lavado 2 veces con solución saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (10000 rpm, 20 min).

El concentrado de proteína fue disuelto en 15 mL de agua desionizada, colocado en unidad de concentración de corte molecular 100 KiloDalton (KD) (Amicón Ultra-15, Millipore, No. Cat. UFC910024) y sometido a 5000 rpm durante 30 min a 10°C. Se obtuvieron 200  $\mu\text{L}$  de concentrado de proteína, que fue lavado y dializado con 12 mL de una solución buffer a 20 mM de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH 7. Posteriormente el concentrado de proteína obtenido fue llevado a 1.5mL con buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e inyectado a una columna de cromatografía de afinidad en columna Hi Trap Protein G de 1 mL (GE Healthcare, No. Cat 17-0404-03) a una velocidad aproximada de 1mL/min con el fin de permitir que la mayor parte de la proteína de interés (IgG) quedase unida a la columna.

La columna fue previamente acondicionada mediante la inyección de 5 volumen columna (vc) de agua desionizada y 10 vc de buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.

Posterior a la inyección de la muestra, se lavó la columna con 5 vc de buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , con el fin de asegurar la salida de todas las proteínas de desecho de la columna (como la albúmina). Se colectaron fracciones de aproximadamente 1 mL.

Dado que la proteína de interés queda unida a la columna de afinidad, se inyectaron 7 vc de buffer de elución (0.1M Gly-HCl pH 2.7) y se colectaron fracciones de 1 mL en tubos de microcentrífuga con 100 µL de buffer TRIS-HCl pH 9, empleado para neutralizar la muestra y evitar daño a la proteína.

Se determinó el contenido de proteína de las fracciones obtenidas mediante espectrofotometría de luz UV-visible a 280 nm (NanoDrop 1000 Thermo scientific spectrophotometer).

Las fracciones correspondientes a la elución fueron concentradas y dializadas contra PBS en unidad de concentración de 100 KD. A las fracciones obtenidas se les determinó contenido de IgG mediante espectrofotometría de luz UV-visible a 280 nM. Con la finalidad de verificar la pureza de la proteína, las muestras fueron analizadas en un gel desnaturizante SDS-PAGE al 12%.

Para la conservación de la columna esta fue lavada con 5 vc de agua desionizada y 5 vc de etanol (EtOH) al 70%.

#### **7.10. Purificación de AcM recombinante humanizado**

Se obtuvo un estándar interno de AcMrh a partir de 250 mL de caldo de cultivo celular a 100 nM de MTX; este fue colocado en unidades de concentración de corte molecular 30 KD (Centricón Plus-20, Millipore, No. Cat. UFC 2LTK08) y centrifugado a 4000 rpm durante 20 min.

El concentrado obtenido fue llevado a 5 mL con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7 y purificado por cromatografía de afinidad en columna Hi Trap Protein G de 1 mL (GE Healthcare, No. Cat 17-0404-03), previamente acondicionada. Después de la inyección de la muestra a una velocidad aproximada de 1 mL/min, se inyectaron 7 vc de buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> con el fin de asegurar la salida de las proteínas de desecho presentes en el concentrado.

Se inyectaron 10 vc de buffer de elución (0.1M Gly-HCl pH 2.7) con el fin de recuperar la mayor cantidad de proteína, fracciones de 1 mL fueron recibidas en tubos con 100 µL de buffer de neutralización TRIS-HCl pH 9.

Las fracciones obtenidas fueron concentradas y dializadas contra agua desionizada en unidad de concentración de 30 KD. Se determinó el contenido de proteína mediante espectrofotometría y se verificó la pureza del AcMr humanizado mediante un gel desnaturizante SDS-PAGE al 12%.

#### **7.11. Determinación del perfil de N-glicosilación del AcMrh.**

Se determinó el patrón de N-glicosilación del AcMrh producido por la línea CHO DG44 PTA 3356 en las diferentes condiciones de amplificación con MTX de 0 a 1600 nM de MTX y la IgGh purificada mediante la metodología de HPLC-Fase Normal descrita por Serrato et al. (2004).

Se procesaron 100 µg de proteína en buffer de fosfato a partir del AcMrh purificado. La proteína fue desnaturizada con una solución de SDS-β-mercaptoetanol y hervida por 5 min, posteriormente se adicionó una solución de detergente IGEPAL 630 al 7%, buffer para PNGasa-F y agua ultrapura (todos reactivos de SIGMA)

Se llevó a cabo la desglicosilación enzimática de la proteína mediante la digestión con una unidad de PNGasa-F (N-Glicosidasa-F 1 U/µL de *Elizabethkingia meningosepticum*, Calbiochem 362185) e incubando por 15h a 37°C. La PNGasa-F permite la remoción completa e intacta de los N-glicanos unidos a las glicoproteínas (complejos, híbridos y altos en manosa).

Con el fin de tener un control interno de concentración conocida de glicanos en la muestra, se adicionó 100 pmol de maltosa (Sigma, M9171) a cada muestra. Posteriormente se eliminó la proteína, mediante precipitación con etanol absoluto a -20°C y llevando los glicanos a sequedad en un concentrador SAVANT SC110A (Thermo Fisher Sc., MA).

Ya que los glicanos, a diferencia de las proteínas, no absorben la luz UV los glicanos libres deben ser marcados para poder ser detectados, separados y cuantificados.

Los glicanos libres de proteína y en sequedad fueron derivatizados en su extremo amino reductor con el colorante fluorescente 2-aminobenzimida (2-AB Proxyme GKK-404, San Leandro CA) mediante una reacción de aminación reductiva a 65°C durante 2 h (Thermo Stat plus, Eppendorf) y posteriormente se congeló a -20°C por 30 min.

Se lavó el exceso de colorante y otros contaminantes hidrofóbicos (no glicanos), mediante cartuchos Glycoclean S (Prozyme) o papel filtro Whatman No. 1 (GE Healthcare, UK) previamente tratados con 1 mL de agua, 5 mL de una solución de ácido acético 30% y 1 mL de acetonitrilo 100%.

Se colocó la muestra en el centro del disco y se añadieron 15  $\mu$ L de acetonitrilo 100% y se dejó absorber por 15 min, posteriormente se lavó el cartucho con 1 mL de acetonitrilo 100%, y 5 x 1 mL de acetonitrilo al 96%.

En un tubo se eluyeron los glicanos con 4 x 500  $\mu$ L de agua ultrapura. Las muestras fueron congeladas y concentradas en SAVANT, finalmente, las muestras se llevaron a un aforo de 100  $\mu$ L con agua y colocadas a -20°C.

Para la cromatografía de fase normal en HPLC se empleó una columna con grupos funcionales polares, los cuales interaccionan con los grupos hidroxilo de los azúcares. La muestra de glicanos 2-AB se inyectó al cromatógrafo en solvente orgánico (80% acetonitrilo - 20% formato de amonio), posteriormente, fueron eluidos bajo un gradiente acuoso. De esta forma los glicanos fueron removidos de la columna y separados en base a su hidrofiliidad, es decir, glicanos pequeños con menos grupos hidroxilo y por tanto menos hidrofílicos eluyeron a bajas concentraciones de solvente acuoso y antes que los glicanos mas grandes (más hidrofílicos). De acuerdo a lo anterior los glicanos fueron analizados mediante un sistema HPLC (controlador 600S, bombas 626, desgasificador en línea AF, auto inyector 717plus marca Waters y software Empower (Milford, MA)) y fase normal utilizando una columna amido (TSKgel Amide-80 TOSOH Bioscience), con un gradiente de acetonitrilo y formato de amonio 25 y/o 250 mM pH 4.4 en corridas de 180 min a 30°C. Se utilizó un detector de fluorescencia (2475 Waters) a una

longitud de onda de 330 nm de excitación y de 420 nm emisión. Se inyectó un volumen de muestra de azúcares equivalente a 5 µg de proteína por corrida. En el análisis de los datos de la corrida cromatográfica se determinó el tiempo de retención, el % de área de cada pico y el área total de glicanos del cromatograma.

Se procedió a la caracterización estructural de los picos obtenidos. 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 2-AB, 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 tercer orden se obtuvo la ecuación para convertir los tiempos de retención a UG y de esta manera proponer estructuras para los picos identificados utilizando bases de datos de estructuras publicadas en la literatura bajo las mismas condiciones cromatográficas (GlycoBase del NIBRT ([https://glycobase.nibrt.ie/glycobase/show\\_nibrt.action](https://glycobase.nibrt.ie/glycobase/show_nibrt.action))).

## 7.12. Reactivos

### ◆ L-Glutamina 200mM (100 mL)

- Se disolvieron 2.92 g de L-Glutamina (Sigma No. Cat, 5763) en agua desionizada, posteriormente se llevó al aforo la solución y fue filtrado por membrana de 0.22 µm, la solución se conservó en alícuotas a -20°C hasta el momento de uso.

### ◆ Azul Tripano 0.2% (100 mL)

- Se disolvieron 0.2g del colorante azul del Tripano (Sigma No. Cat. T-0776) en 100 mL de PBS 1x, la solución se filtró por membrana 0.22µm.

- ◆ Metotrexato 968.22  $\mu\text{M}$  (10 mL)
  - 0.0044 g de Metotrexato (Sigma No. Cat. M 9929) se disolvieron en 10 mL de medio fresco suplementado, la solución se esterilizó mediante filtración por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se colocó en alícuotas de 1 mL a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso. La solución se conservó en oscuridad.
  
- ◆ Solución sobresaturada de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
  - En parrilla de agitación se colocaron 10 mL de agua desionizada y se agregaron gradualmente 1.41 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , (Merck No. Cat. 6649), al observar no posible disolución de compuesto, se aumento velocidad de agitación y temperatura hasta llegar a temperatura de ebullición del agua en donde se observó completa disolución del compuesto, se esterilizó la solución por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .
  
- ◆ Solución buffer de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 20 mM pH 7 (50 mL)
  - Se disolvieron 0.142 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma No. Cat. S0876) en agua desionizada, se llevó al aforo y se ajustó el pH 7.0. La solución se esterilizó por membrana 0.22  $\mu\text{m}$ .
  
- ◆ Solución buffer Glicina-HCl 0.1M pH 2.7 (50 mL)
  - 0.376g de glicina (Merck No. Cat. 4201) fueron disueltos en agua desionizada. La solución se llevó la solución a pH 2.73 con HCl 1M y se esterilizo por membrana 0.22  $\mu\text{m}$ .

◆ PBS 10x (1L)

Se disolvieron 82g NaCl (JT Baker No. Cat. 3624-05), 2g KCl, (JT Baker No. Cat. 3040), 14.4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma No. Cat. S0876) y 2.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma No. Cat. P-5379) en 1L de agua desionizada estéril, se llevó a pH 7.2 y se filtró en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 µm.

◆ Tween 20 a 0.5% en PBS 1x (1L)

- Se añadieron 500 µL de Tween 20 (Sigma No. Cat P-1379) a 1L de PBS 1x.

◆ BSA 10 mg/mL (10 mL)

- 0.10 g de BSA (Equitech, No. Cat BAC651-500) fueron disueltos en 10 mL de PBS 1x, la solución se mantuvo en frasco de vidrio y refrigeración hasta el momento de su uso.

◆ NaOH 3M (30 mL)

- Se disolvieron 3.6g de NaOH (Merck No. Cat. 6498) en agua destilada.

◆ EtOH 70% (50 mL)

- Se adicionaron 15 mL de agua desionizada a 35 mL de EtOH absoluto, la solución fue filtrada con membrana de 0.22 µm.

◆ Ácido acético 30% (100 mL).

- Se añadieron 70 mL de agua destilada a 30 mL de ácido acético glacial

## 8. CONSIDERACIONES MATEMÁTICAS Y ESTADÍSTICAS. NOMENCLATURA DE OLIGOSACÁRIDOS.

### **Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )**

Se determinó la  $\mu$  en la fase de crecimiento exponencial de las células al ser esta etapa lo más representativo de un crecimiento sin limitación de nutrientes ni acumulación de productos de desecho. Esta es calculada a partir de una regresión lineal obtenida de graficar  $\ln(X/X_0)$  contra el tiempo, de acuerdo a un modelo de crecimiento exponencial tipo Monod

$$(1) \quad \frac{dx}{dt} = \mu X$$

Integrando

$$(2) \quad \ln \frac{X}{X_0} = \mu t$$

Donde

X: es la concentración celular viable

X<sub>0</sub>: Concentración inicial

t: tiempo en horas

### **Tiempo de duplicación**

$$(3) \quad t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Las velocidades específicas de consumo y producción de los principales metabolitos (glucosa, Glutamina y lactato) fueron determinadas en la fase exponencial de crecimiento para todas las condiciones.

## Velocidad específica de consumo y producción de metabolitos y anticuerpo monoclonal

$$(4) \quad q_{Analito} = \left| \frac{\Delta_{Analito}}{\Delta_{Xv}} \right| \mu$$

### Consideraciones estadísticas

Desviación estándar (SD): Empleada como medida de dispersión con respecto al valor promedio.

Coefficiente de correlación (R): Empleado como medida de la relación lineal entre variables

Programa estadístico Minitab versión 17.2.1

### 9. NOMENCLATURA DE OLIGOSACÁRIDOS.

A#: Se refiere al número de antenas. Cuando se utiliza esta nomenclatura A incluye al núcleo de quitobiosa, las manosas y las N-acetilglucosaminas correspondientes.

F o B: Se agregan después de A si el núcleo del azúcar contiene fucosa (F) y/o esta bisectado (B).

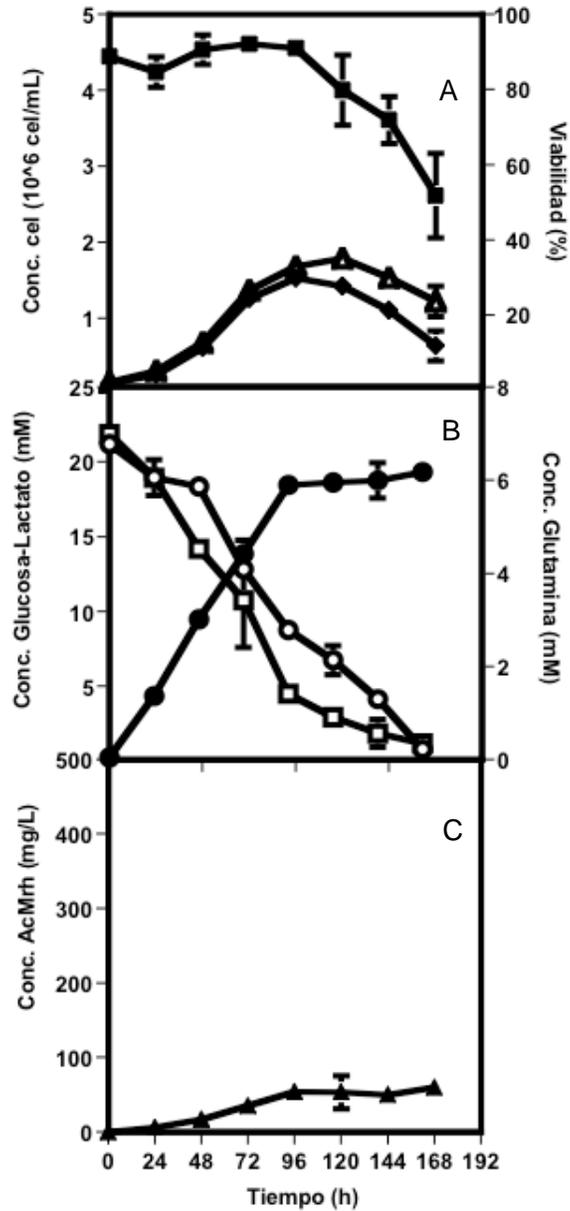
G#: indica el número de galactosas.

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 quitobiosa.

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.1. Caracterización cinética de la línea celular CHO DG44



**Figura 1.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular CHO DG44 PTA 3356 sin estímulo con MTX. A. Concentración celular viable (◆), Concentración celular total (△), Viabilidad (■); B. Concentración de glucosa (○), Concentración de lactato (●), Concentración de glutamina (□); C. Concentración de AcMrh (▲)

En la **Figura 1** se muestra que la línea celular CHO DG44 PTA 3356 sin MTX alcanzó una concentración celular máxima viable de  $1.5 \times 10^6$  cel/mL a las 96 h de cultivo, a partir de este tiempo y aun en presencia de glucosa y glutamina, se observó la disminución de la concentración celular viable y la viabilidad.

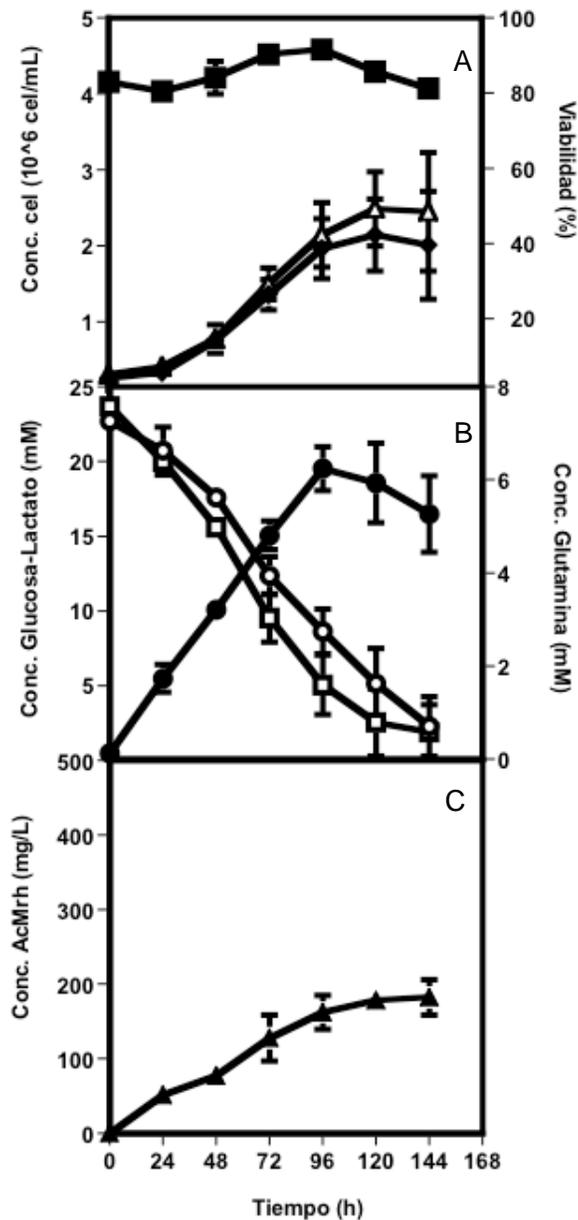
Con respecto a los perfiles de consumo de glucosa y glutamina, ambos metabolitos se agotaron a las 168 horas de cultivo. El perfil de producción de lactato mostró un incremento de la concentración de 0 a 20 mM durante las primeras 96 h de cultivo; tiempo después del cual la concentración de dicho metabolito se mantuvo constante.

La producción de AcMrh alcanzó una concentración de 53 mg/L a las 96h de cultivo. No se observó un incremento en la producción de AcMrh durante las 72 horas posteriores de cultivo. Se alcanzó la concentración máxima de AcMrh de 70 mg/L a las 168 horas.

La **Figura 2** corresponde a la caracterización cinética de la línea celular en el primer nivel de amplificación con MTX (100 nM). En este nivel de amplificación se alcanzó una concentración celular viable máxima promedio de  $2 \times 10^6$  cel/mL y 90% de viabilidad en el cultivo a las 96 h.

Al igual que en los cultivos sin MTX, la concentración de lactato alcanzó un máximo de 20 mM a las 96 h de cultivo, tiempo después del cual la concentración de lactato se mantuvo constante e incluso se observó una disminución. La glucosa y glutamina se agotaron hasta las 144 h de cultivo, sin embargo, a las 96 horas de cultivo se observó que cesó el crecimiento aun en presencia de glucosa y glutamina.

A 100 nM de MTX, la producción de anticuerpo monoclonal recombinante humanizado alcanzó un máximo de 190 mg/L a las 144 h de cultivo, es decir, 3 veces más que en el cultivo sin amplificación con MTX en el mismo periodo de tiempo. Al igual que en los cultivos sin MTX, a partir de las 96 horas el incremento en la producción de AcMrh es mínima y coincide con el cese del crecimiento celular.

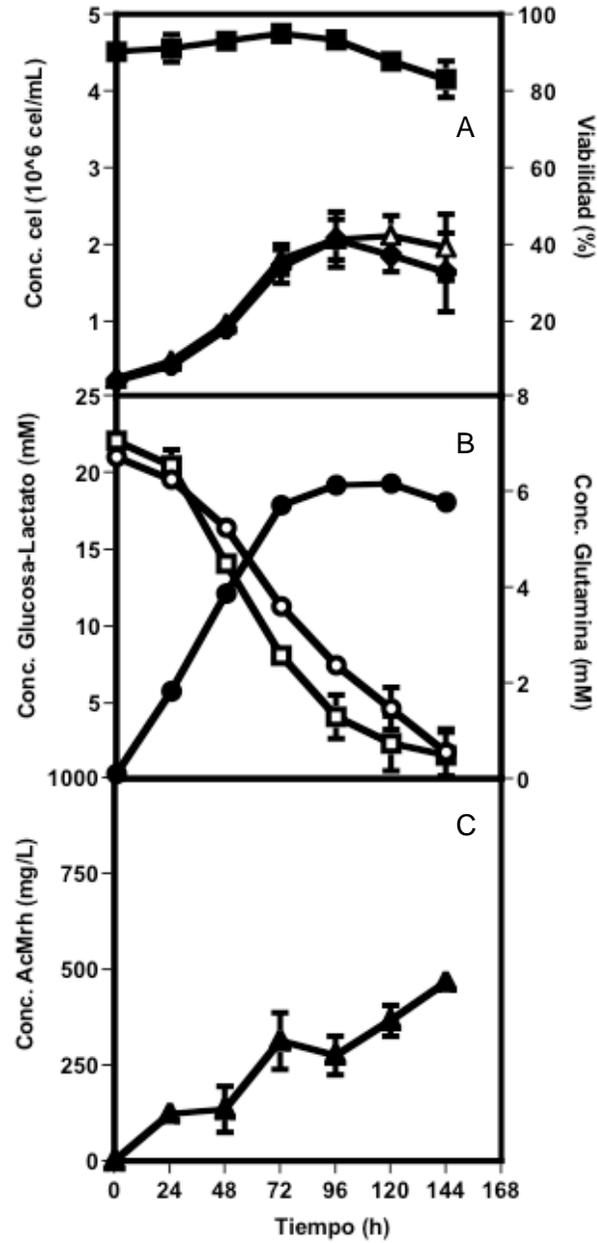


**Figura 2.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 100 nM de MTX. A. Concentración celular viable (◆), Concentración celular total (△), Viabilidad (■); B. Concentración de glucosa (○), Concentración de lactato (●), Concentración de glutamina (□); C. Concentración de AcMrh (▲)

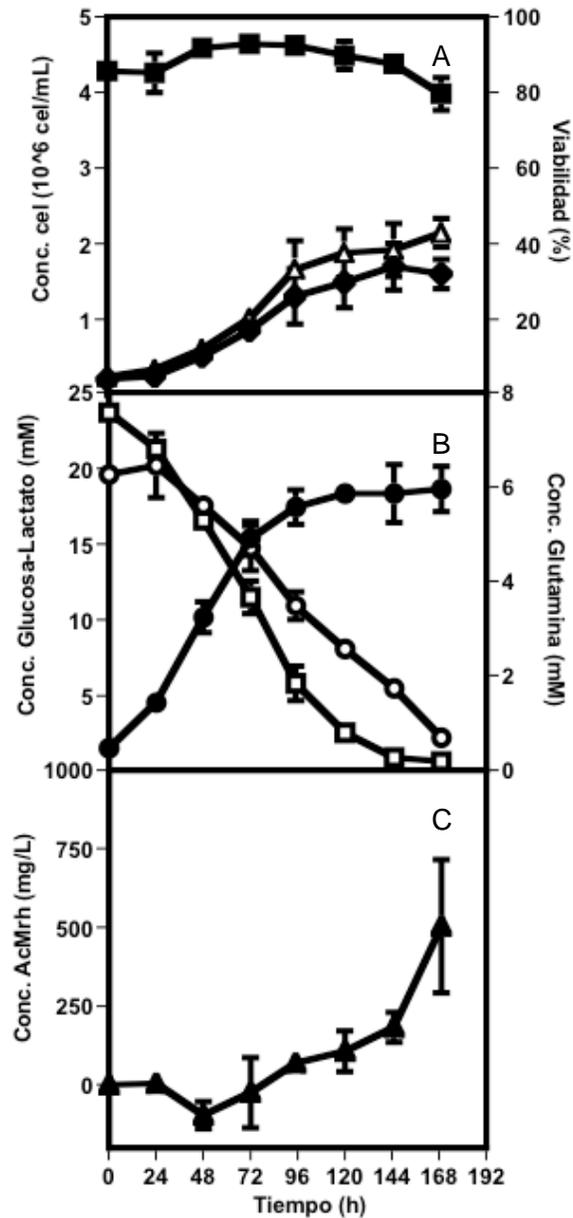
Con respecto al perfil de crecimiento a una concentración de amplificación de 200 nM de MTX (**Figura 3**) se alcanzó una concentración celular viable máxima de  $2 \times 10^6$  cel/mL a las 96 h de cultivo, similar a lo observado en la cinética de crecimiento a 100 nM de MTX.

Los perfiles de consumo de glucosa y glutamina fueron similares a los cultivos a 0 y 100 nM de MTX, sin agotamiento de glucosa y glutamina a las 96 horas de cultivo, tiempo al que se alcanzó la mayor concentración celular viable. Así mismo, no se observaron cambios en la cinética de producción de lactato comparado con 0 y 100 nM de MTX alcanzándose concentraciones cercanas a 20 mM a las 96 h de cultivo.

La producción de AcMrh en cambio, mostró un aumento consistente a lo largo de toda la cinética, alcanzándose una concentración máxima de 460 mg/L al tiempo final del cultivo (144 h), es decir, 9 veces más que el cultivo sin MTX durante el mismo periodo de tiempo, y 2.5 veces más que lo observado en el primer nivel de amplificación.



**Figura 3.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 200 nM de MTX. A. Concentración celular viable (◆), Concentración celular total (△), Viabilidad (■); B. Concentración de glucosa (○), Concentración de lactato (●), Concentración de glutamina (□); C. Concentración de AcMrh (▲)



**Figura 4.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 400 nM de MTX. A. Concentración celular viable (◆), Concentración celular total (△), Viabilidad (■); B. Concentración de glucosa (○), Concentración de lactato (●), Concentración de glutamina (□); C. Concentración de AcMrh (▲)

De acuerdo con en el perfil cinético de crecimiento de la línea celular CHO DG44 amplificada a una concentración de 400 nM de MTX (**Figura 4**) se observó que la concentración celular viable máxima fue de  $1.8 \times 10^6$  cel/ml cercano a las 144 h de cultivo, aproximadamente la misma concentración celular a lo observado en los cultivos a concentraciones inferiores de MTX, aunque 48 horas más tarde.

Con respecto al perfil de consumo de metabolitos a diferencia de los cultivos entre 0 y 200 nM de MTX, donde no se observó agotamiento de la glucosa ni la glutamina cuando se alcanzó la máxima concentración celular viable (a las 96 h), en este nivel de amplificación se observó el agotamiento de la glutamina a las 144 h de cultivo y de la glucosa a las 168 h de cultivo.

En el caso de la producción de lactato, la concentración máxima alcanzada fue alrededor de 20 mM, similar a la de los cultivos entre 0 y 200 nM de MTX, y se mantuvo constante después de alcanzar dicha concentración hasta el tiempo final de cultivo.

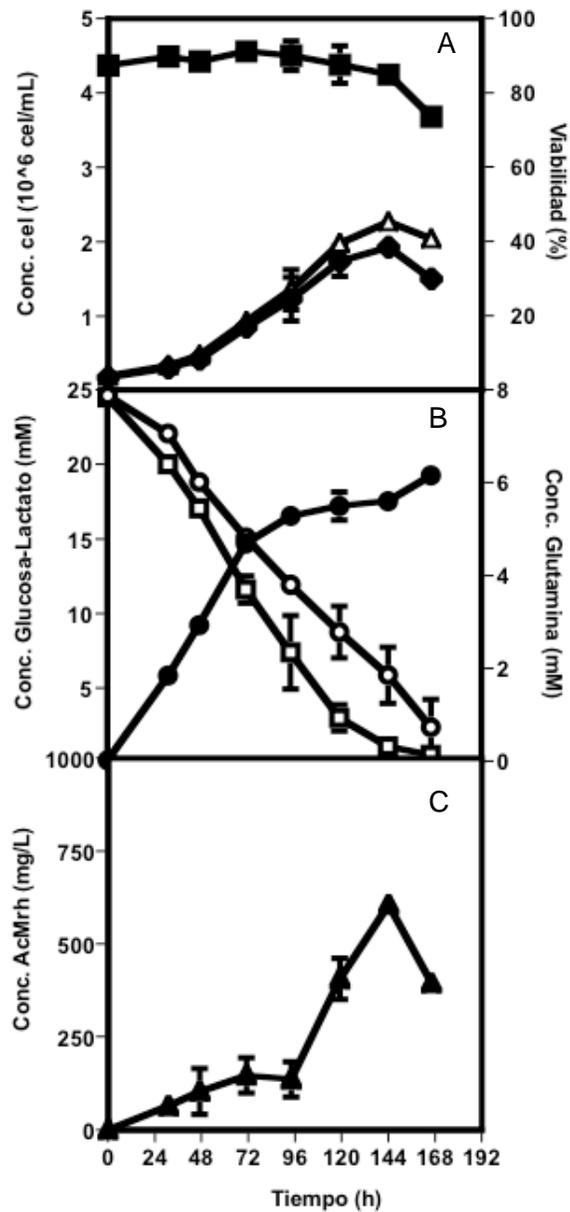
Al tiempo final de los cultivos (168 h) se alcanzó una concentración máxima de AcMrh de  $500 \pm 200$  mg/L, similar a la concentración obtenida en los cultivos a 200 nM de MTX.

En las cinéticas de crecimiento de células CHO-DG44 a una concentración de amplificación con 800 nM de MTX (**Figura 5**) se alcanzó una concentración celular viable máxima de  $2 \times 10^6$  cel/mL, similar a la concentración alcanzada en todas las condiciones anteriores de amplificación, sin embargo, al igual que en los cultivos a 400nM de MTX dicha concentración se alcanzo a las 144 h de cultivo.

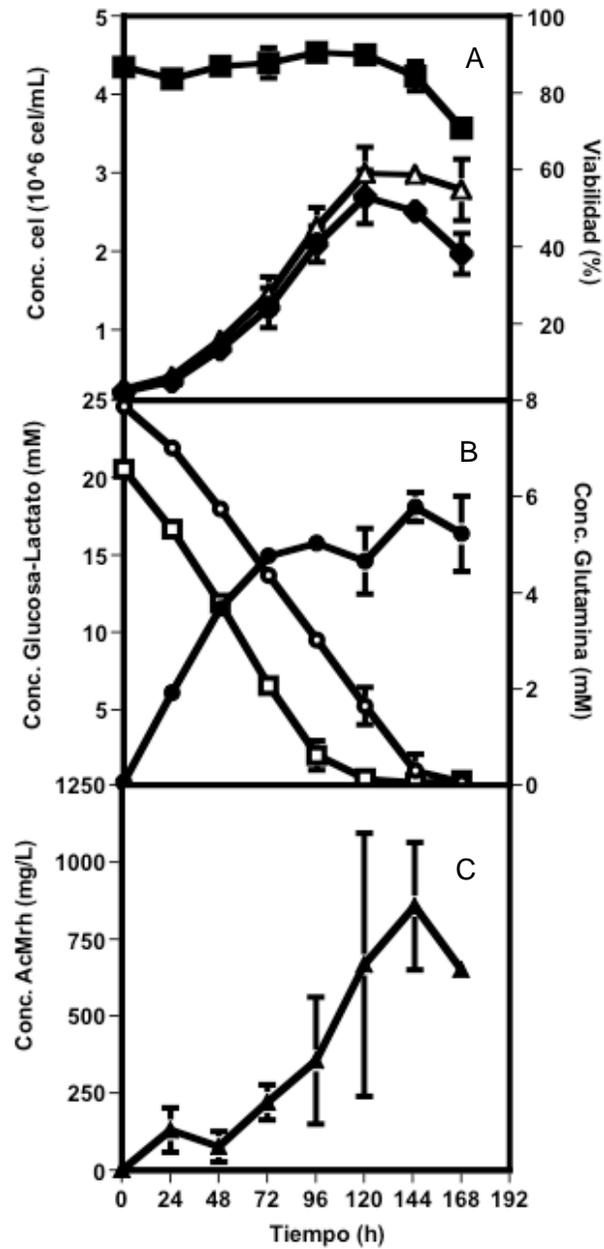
Con respecto al consumo de metabolitos, al igual que en los cultivos a 400 nM, se observó el agotamiento de la glutamina y no de la glucosa a las 144 h (cuando se alcanzó la máxima concentración celular).

A 800 nM de MTX la concentración máxima de lactato alcanzada fue de entre 18 y 19 mM.

Con respecto al perfil de producción de AcMrh se determinó una concentración máxima de 600 mg/L de AcMrh en los tiempos finales de cultivo, esto es, una concentración similar a la de los cultivos a 400 nM de MTX y fue 10 veces mayor a lo determinado en el nivel sin amplificación con MTX.



**Figura 5.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 800 nM de MTX. A. Concentración celular viable (◆), Concentración celular total (△), Viabilidad (■); B. Concentración de glucosa (○), Concentración de lactato (●), Concentración de glutamina (□); C. Concentración de AcMrh (▲)



**Figura 6.** Perfil cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh de la línea celular amplificada con 1600 nM de MTX. A. Concentración celular viable (◆), Concentración celular total (△), Viabilidad (■); B. Concentración de glucosa (○), Concentración de lactato (●), Concentración de glutamina (□); C. Concentración de AcMrh (▲)

El perfil cinético de la línea celular CHO DG44 a una concentración de amplificación de 1600 nM de MTX (**Figura 6**) mostró un crecimiento exponencial del tiempo 0 al tiempo 120 en donde se alcanzó una concentración celular viable máxima de  $2.7 \pm 0.25 \times 10^6$  cel/mL, es decir, casi un 30% más que la concentración celular alcanzada en todas las condiciones anteriores de amplificación.

Con respecto al consumo de metabolitos, los perfiles de consumo de glucosa y glutamina fueron similares a los observados en las condiciones de amplificación de 400 y 800 nM de MTX, con agotamiento de glutamina cuando se alcanzó la concentración celular viable máxima, sin embargo, a 1600 nM de MTX ocurrió a las 120 h de cultivo en vez de las 144 h. Con respecto al perfil de producción de lactato, al igual que en la condición de 800 nM de MTX, sólo se alcanzó una concentración máxima de 18 mM a las 144h de cultivo.

En cuanto a la producción de AcMrh en esta condición de amplificación, se alcanzó una concentración máxima de  $850 \pm 200$  mg/L de AcMrh al tiempo 144h por lo que se puede considerar que la concentración máxima alcanzada fue superior a la obtenida en la condición de amplificación de 800nM de MTX y fue 12 veces mayor a lo obtenido en el nivel sin amplificación.

De acuerdo a lo observado en los niveles de amplificación de 0 a 200 nM de MTX, la concentración celular viable máxima se alcanzó alrededor de las 96 h de cultivo. A dicho tiempo se registró una concentración máxima de lactato de 20 mM aún en presencia de glucosa y glutamina en el medio de cultivo. De acuerdo a lo reportado por Gódia & Cairó (2006) y Lao & Toth (1997) es muy probable que la alta concentración de lactato en el medio haya inhibido el crecimiento celular debido al cambio de pH ó al incremento de la osmolaridad.

En las cinéticas con 200 nM de MTX se observó que a partir de las 96h de cultivo, la concentración de lactato disminuyo ligeramente, aún en presencia de glucosa y glutamina en el medio, por lo que se puede proponer que hubo un consumo de dicho metabolito de desecho. Zagari et al. (2013) asocian el consumo de lactato debido a la baja disponibilidad de glucosa y glutamina en etapas avanzadas del

cultivo, además, ante un deterioro en el metabolismo oxidativo en la mitocondria, se pueden producir cambios en las enzimas implicadas en el transporte de nutrientes y a partir de ahí introducir el lactato al ciclo de los ácidos tricarbónicos.

A 400 nM de MTX, la concentración de lactato alcanzó los 20 mM cercano a las 120 h y no se observó que el metabolito fuera consumido por la línea celular, como sucedió en el nivel anterior de amplificación con 200 nM de MTX.

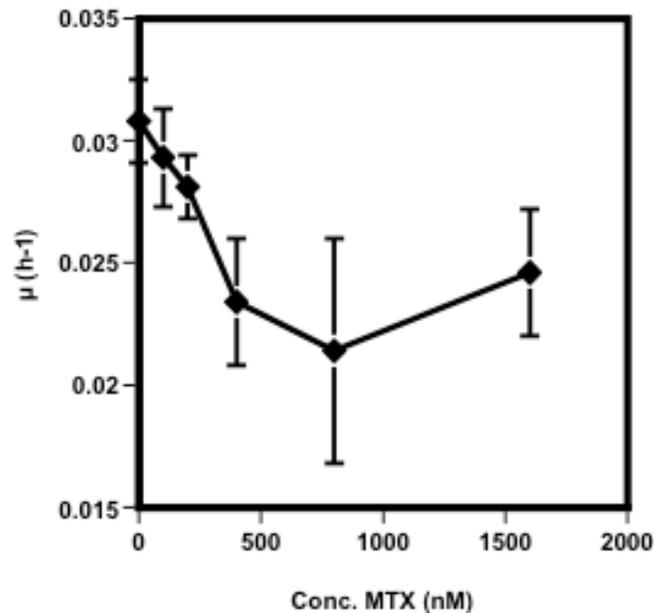
Los resultados obtenidos de las cinéticas a 400, 800 y 1600 nM de MTX mostraron que la concentración celular máxima alcanzada en cultivo se obtuvo entre las 120 y 144 h de cultivo, es decir, de 24 a 48 h después que en los cultivos a 0, 100 y 200 nM de MTX. Es posible que el incremento en el tiempo de cultivo haya tenido un impacto en la concentración máxima de AcMrh alcanzada en los cultivos a 800 y 1600 nM de MTX donde no se observó un incremento en la velocidad de producción de AcMrh.

A 800 y 1600 nM de MTX no se observaron efectos de la inhibición del crecimiento por el cambio en el pH o la osmolaridad, es decir, que la concentración celular viable máxima alcanzada en dichos niveles de amplificación dependió de la concentración de nutrientes (glucosa y glutamina) disponibles en el medio. Durante la cinética a 800 nM de MTX la glutamina se agotó cercano a las 144 h de cultivo y su depleción tuvo efecto en el cese del crecimiento celular. En el caso de los cultivos a 1600 nM de MTX, la glutamina se agotó a las 120 h de cultivo y la glucosa a las 144hrs.

Así mismo se observó que a 1600 nM de MTX la concentración celular viable alcanzada fue de  $2.7 \times 10^6$  cel/mL, es decir, fue un 30% mayor a la concentración celular viable máxima obtenida en todas las demás condiciones de amplificación, sin embargo, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas.

A partir de las cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos y producción de AcMrh en las diferentes condiciones de amplificación con MTX se calcularon las velocidades específicas de crecimiento, la velocidad de consumo de metabolitos (glucosa y glutamina), velocidad de producción de lactato, el

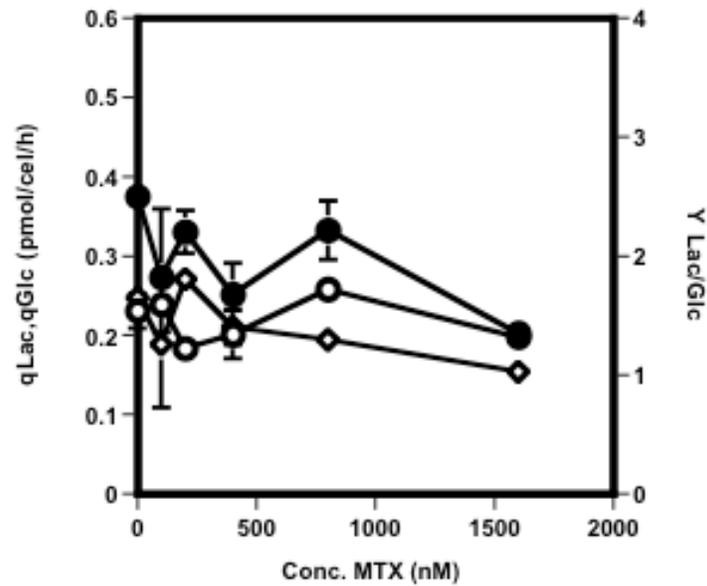
rendimiento lactato/glucosa, así como la velocidad de producción de AcMrh para cada condición de amplificación con MTX.



**Figura 7.** Velocidad específica de crecimiento en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

De acuerdo a lo observado en la **Figura 7**, hubo una disminución en la velocidad específica de crecimiento, principalmente a partir de 400 nM de MTX donde la velocidad específica de crecimiento fue casi 30% menor que en el cultivo sin MTX. Lo anterior concuerda con lo reportado por Brezinsky et al. (2003) donde las células expuestas a concentraciones mayores de 250 nM de MTX tienen un impacto negativo sobre la velocidad específica de crecimiento. Algunos autores como Jiang et al (2006), explican la disminución de la velocidad de crecimiento como un efecto del MTX sobre el metabolismo de la línea celular causado por la sobre expresión de la proteína exógena en la línea celular.

En los niveles superiores de amplificación, es decir, 800 y 1600 nM de MTX, no se observaron cambios en la velocidad específica de crecimiento con respecto a 400 nM de MTX, incluso a 1600 nM de MTX se observó una recuperación de la velocidad de crecimiento en comparación con 400 y 800 nM.



**Figura 8.** Velocidad de consumo de glucosa, producción de lactato y rendimiento lactato/glucosa en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.  $q_{Glc}$  (○),  $q_{Lac}$  (●) y  $Y_{Lac/Glc}$  (◇).

De acuerdo a lo observado en la **Figura 8**, no se observaron cambios en las velocidades de consumo de glucosa en los diferentes niveles de amplificación, lo que es consistente con los perfiles de consumo de glucosa obtenidos durante las cinéticas en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX (0 a 1600 nM de MTX). La velocidad de producción de lactato a 0 nM de MTX fue de 0.37 pmol/cel/h, mientras que en los niveles de amplificación entre 100 y 800 nM de MTX fue en promedio 0.3 pmol/cel/h, es decir, 20 % menor con respecto al nivel sin MTX, así mismo, se observó que a 1600 nM de MTX la velocidad de producción de lactato fue de 0.20 pmol/cel/h, es decir que a 1600 nM de MTX la velocidad de producción de lactato fue 45% menor que a 0 nM de MTX.

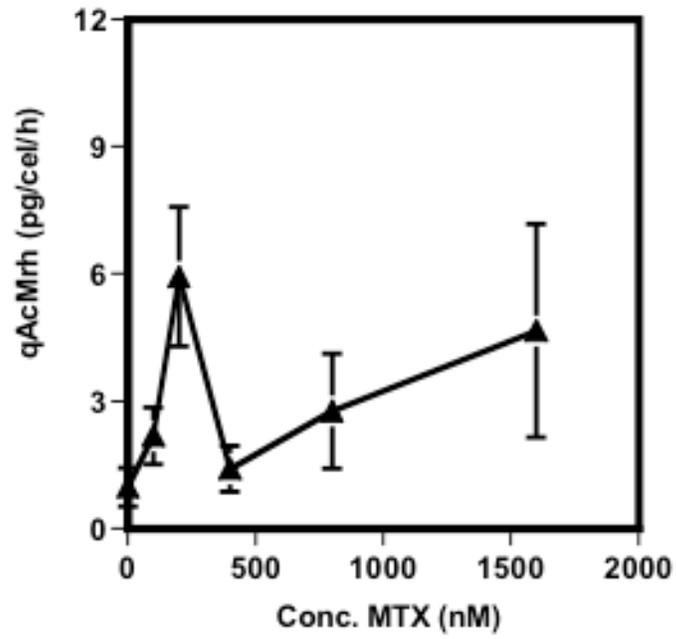
La determinación del rendimiento lactato/glucosa ( $Y_{Lac/Glc}$ ) a 200 nM de MTX fue 20 % mayor que lo observado a 0 nM de MTX, esto puede explicarse por el estrés generado por la exposición a MTX y la sobreproducción de la proteína. En los niveles de amplificación de 400, 800 y 1600 nM de MTX se obtuvieron valores de 1.36, 1.29 y 1.03 respectivamente.

Al igual que la velocidad de consumo de glucosa, la velocidad de consumo de glutamina, no mostró diferencias en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

Brezinski et al (2003), Jiang et al (2006), Chusainow et al. (2009) y De Jesús & Wurm (2011) establecen que la velocidad de producción de AcM para una clona productora de AcM es aproximadamente entre 2 y 3 pg/cel/h. De acuerdo a lo observado en la **Figura 9**, la velocidad de producción de AcMrh tuvo un máximo de  $6 \pm 1.6$  pg/cel/h en la condición de 200 nM de MTX, esto fue significativamente mayor que los niveles con 0 y 100 nM de MTX donde la velocidad de producción de AcMrh fue de 1 y 2 pg/cel/h respectivamente. Sin embargo, la velocidad de producción de AcMrh obtenida a 200 nM no se mantuvo en los niveles subsecuentes de amplificación. Las velocidades de producción de AcMrh a 400, 800 y 1600 nM de MTX fueron de 1.4, 2.8 y 4.6 pg/cel/h respectivamente.

A pesar de las variaciones observadas en la velocidad de producción de AcMrh en las diferentes condiciones de amplificación con MTX, la concentración máxima de AcMrh alcanzado en cultivo mostró una tendencia a aumentar conforme se incrementó la concentración de MTX. Es así que a 1600 nM de MTX la concentración de AcMrh fue significativamente mayor que lo determinado en los niveles de amplificación de 0 a 400 nM de MTX.

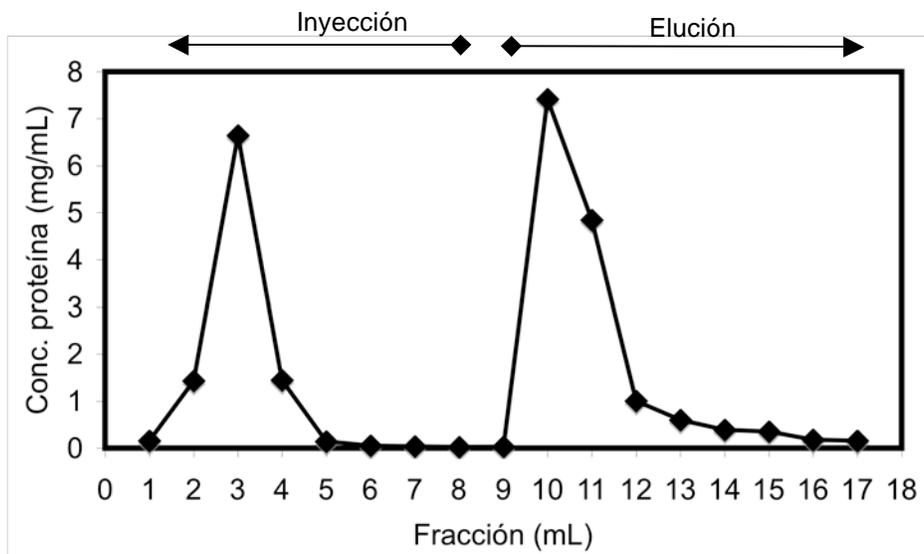
Dado que el tiempo de cultivo a niveles de amplificación de 400 a 1600 nM de MTX se extendió de 24 a 48 h, es posible que el incremento en la concentración máxima de AcMrh se deba a este fenómeno y no principalmente al incremento en la velocidad de producción de AcMrh.



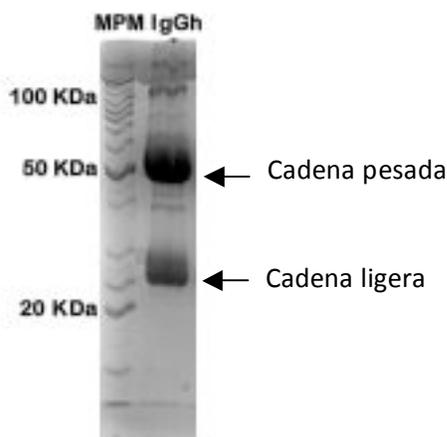
**Figura 9.** Velocidad de producción de AcMrh en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

## 10.2. Purificación de la inmunoglobulina G humana y el Anticuerpo Monoclonal recombinante humanizado

El siguiente cromatograma correspondiente a la purificación de IgG humana mediante cromatografía de afinidad con proteína G (**Figura 10**). Se observa que la proteína de desecho presente en el concentrado alcanzó el mínimo en las fracciones 6 a 8, antes de la elución (fracciones 9 en adelante) lo que es indicativo de la pureza de la proteína purificada (IgG humana). El gel desnaturalizante SDS-PAGE muestra las bandas correspondientes a las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina (**Figura 11**).

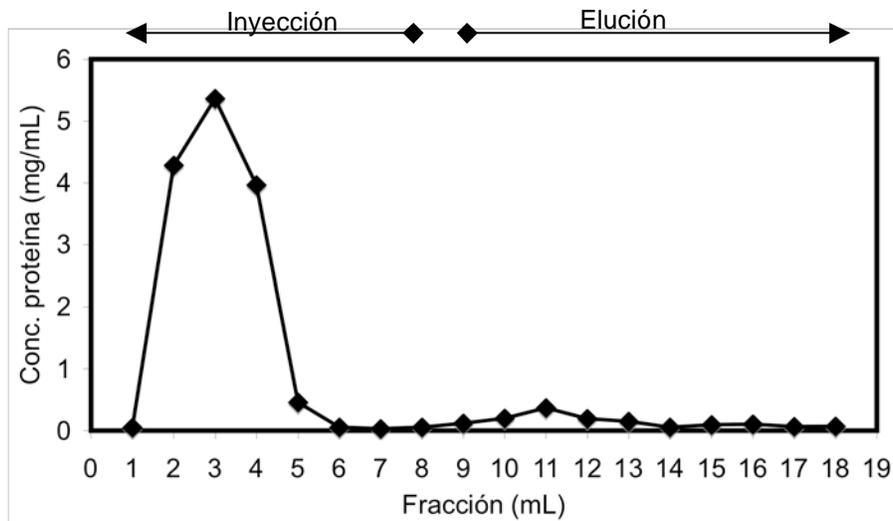


**Figura 10.** Cromatograma de purificación de IgG humana. Perfil de purificación de IgG humana por cromatografía de afinidad.



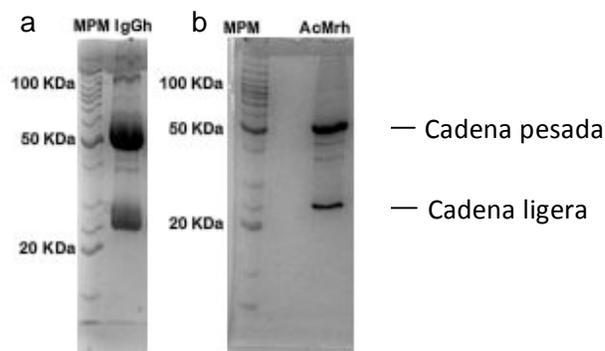
**Figura 11.** SDS-PAGE IgG humana. Bandas correspondientes a cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina.

La **Figura 12** corresponde al cromatograma obtenido de la purificación del anticuerpo monoclonal recombinante humanizado mediante cromatografía de afinidad. De acuerdo al cromatograma las fracciones 1 a 8 (correspondientes a la inyección) mostró que las proteínas de desecho presentes en el concentrado alcanzaron una concentración aproximada de 5 mg/mL, mientras que en las fracciones correspondientes a la elución (fracciones 9 en adelante) la concentración de AcMrh purificado no alcanza 1 mg/mL, es posible que se haya perdido proteína durante la concentración del caldo sobrenadante de cultivo o posibles problemas de afinidad a la columna de purificación por cromatografía de afinidad con proteína G.



**Figura 12.** Cromatograma de purificación AcMrh. Perfil de purificación de cultivos a 100 nM de MTX.

Con el fin de identificar las características de tamaño de la proteína purificada se realizó un gel SDS-PAGE a 12% obteniendo se los siguientes resultados (**Figura 13**).

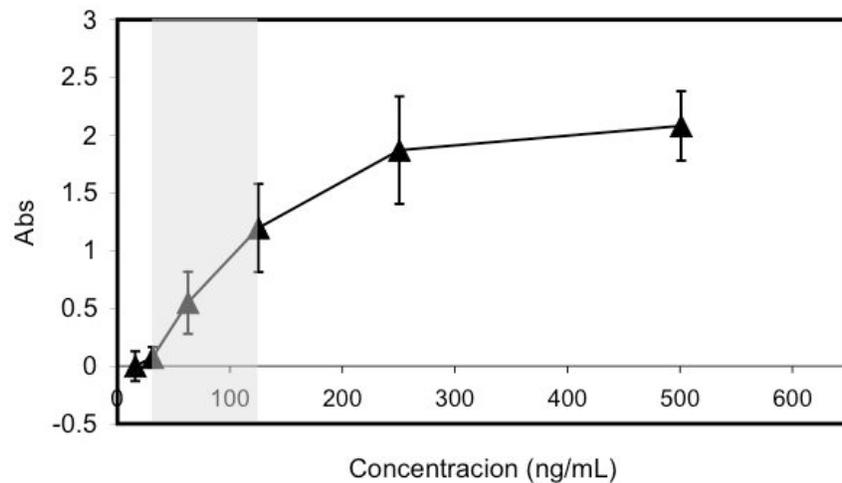


**Figura 13.** Comparativo SDS-PAGE de IgGh y AcMrh. Bandas correspondientes a cadenas ligera y pesada de IgGh (a) y AcMrh (b).

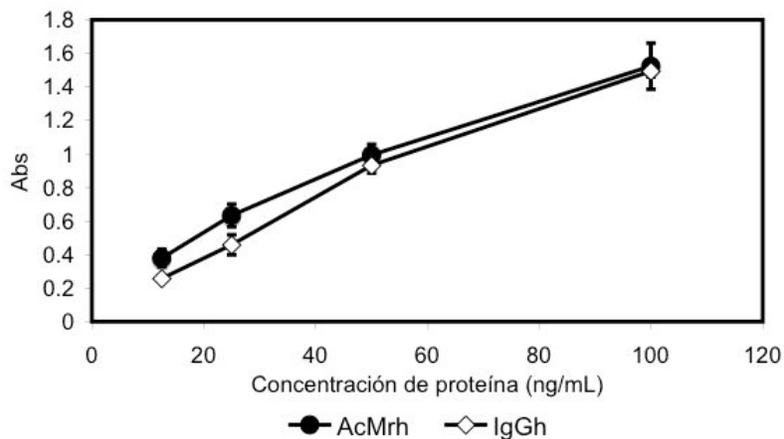
De acuerdo a los resultados anteriores el AcMrh presentó un tamaño similar a la IgG humana

### 10.3. Ensayo inmuno-enzimático (ELISA)

A partir de diluciones seriadas de una solución de IgG humana (IgGh) de concentración conocida se determinó que el rango lineal de la prueba ELISA, empleada para la determinación de la concentración de AcMrh producido en cultivo es de 15-120 ng/mL (**Figura 14**). Para las determinaciones se realizaron curvas estándar con diluciones seriadas a partir de 100 ng/mL.



**Figura 14.** Determinación del rango lineal de la prueba ELISA. Curva estándar realizada a partir de diluciones seriadas de una concentración de IgG humano purificado, en área gris rango lineal de la prueba.

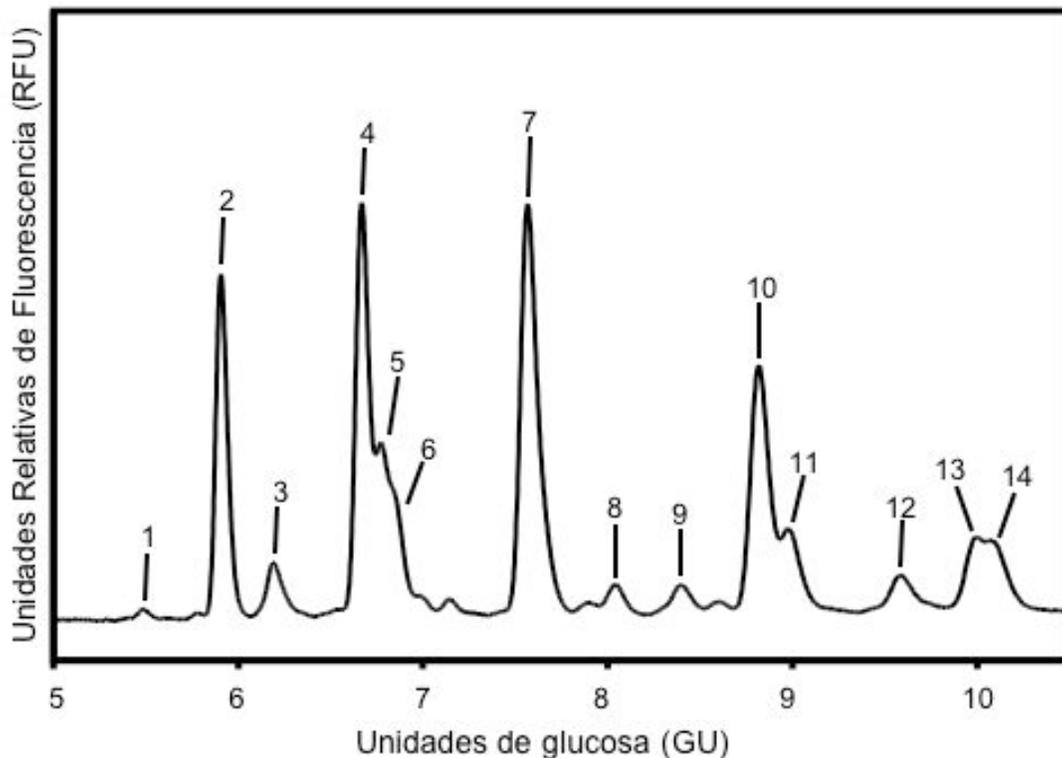


**Figura 15.** Curva estándar AcMrh e IgGh. Comparativo de curvas estándar de AcMrh e IgGh.

En la **figura 15** se muestra que el AcMrh producido por la línea celular CHO DG44 ATCC PTA 3356 puede ser reconocido por los anticuerpos empleados en el ensayo de ELISA.

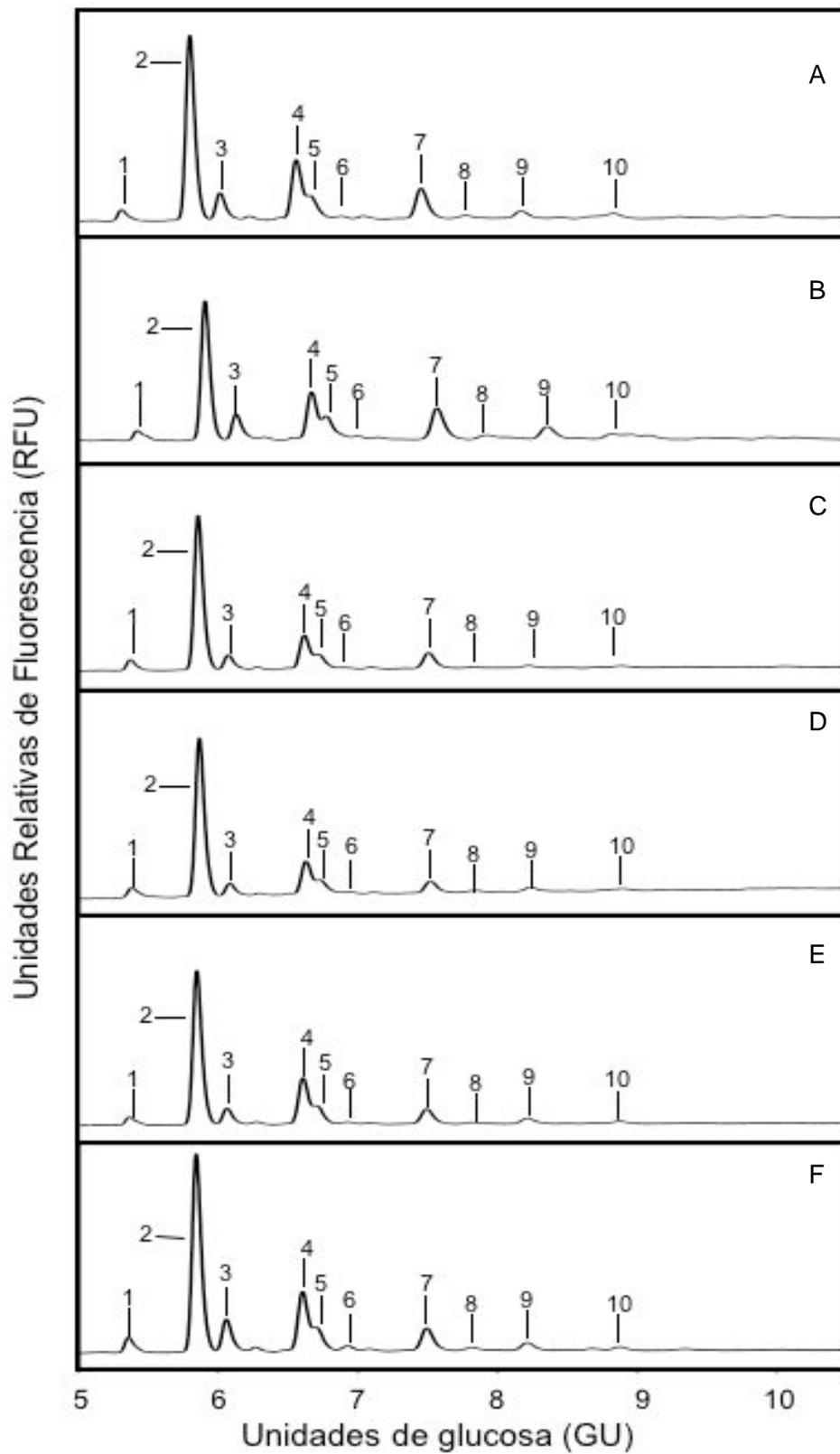
#### 10.4. Perfiles de N-glicosilación de la IgGh y el AcMrh.

La **Figura 16** representa el perfil de glicosilación obtenido en la IgGh purificada, En base a las unidades de glucosa (GU) y alo reportado en la glicobase, en la IgGh purificada se encontraron estructuras altas en manosa y estructuras complejas como a-galactosiladas (G0), mono-galactosiladas (G1) y bi-galactosiladas (G2) así como estructuras multiantenarias y/o sialidades.



**Figura 16.** Cromatograma de glicosilación IgG humana purificada

Así mismo estas estructuras (altas en manosa, a-galactosiladas, mono-galactosiladas, bi-galactosiladas multiantenarias y sialidades) fueron encontradas en el AcMrh producido en las diferentes condiciones de amplificación con MTX representados en la **Figura 17**.



**Figura 17.** Perfiles de glicosilación de AcMrh en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX. A. 0 nM, B. 100 nM, C. 200 nM, D. 400 nM, E. 800 nM, F. 1600 nM.

La derivatización de los glicanos con el colorante fluorescente 2-AB hace de este un método cuantitativo, por lo que la integración de las áreas de los picos identificados en el cromatograma permite conocer la proporción de las estructuras glicosiladas identificadas en el cromatograma. La **Tabla 2** contiene el porcentaje de área de las principales estructuras identificadas en los cromatogramas en las diferentes condiciones de amplificación con MTX y para la IgGh.

**Tabla 2.** Estructuras propuestas de acuerdo a las estructuras reportadas en GlycoBase en base a unidades de glucosa.

Pico	Unidades de glucosa	Estructura propuesta	%Área por concentración de amplificación con MTX						
			IgGh	0 nM	100 nM	200 nM	400 nM	800 nM	1600 nM
1	5.33	A2	0.00	2.95	2.60	3.85	3.83	2.99	3.62
<b>2</b>	<b>5.90</b>	<b>A2F</b>	<b>16.37</b>	<b>48.92</b>	<b>42.64</b>	<b>61.99</b>	<b>62.95</b>	<b>58.06</b>	<b>52.42</b>
3	6.12	M5	3.31	7.88	9.00	6.25	4.85	6.63	9.10
<b>4</b>	<b>6.67</b>	<b>A2FG1 (1,6)</b>	<b>19.19</b>	<b>15.97</b>	<b>14.39</b>	<b>13.86</b>	<b>12.88</b>	<b>17.84</b>	<b>15.50</b>
5	6.77	A2FG1(1,3)	7.51	6.58	9.06	5.73	5.95	6.14	6.27
6	6.84	A2G2S1 ó A2G1S1 ó A4F	3.93	1.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>7</b>	<b>7.56</b>	<b>A2FG2</b>	<b>21.82</b>	<b>8.75</b>	<b>11.17</b>	<b>6.95</b>	<b>4.39</b>	<b>6.01</b>	<b>6.54</b>
8	7.93	A2G2S1	1.30	1.52	1.78	0.00	0.00	0.00	1.31
9	8.35	A2G2S2 ó A3G3	1.52	2.59	4.51	1.38	1.76	2.33	2.43
10	8.82	FA2G2S2 ó FA2G2S2 ó A3G3S1	12.21	1.43	1.72	0.00	1.03	0.00	0.00
11	8.93	A3G3S1 ó A3G2S2	4.20	0.00	1.66	0.00	0.00	0.00	0.00
12	9.59	A3G3S2 ó A4G4	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13	10.00	FA3G3S3 ó FA4G4S1	2.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14	10.07	FA4G4 ó A3G3S3	3.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

\*A2: Estructura bi-antenaria agalactosilada (G0). F: fucosa. G: Galactosa

**Tabla 3.** Contenido de estructuras manosiladas, galactosiladas y fucosiladas encontradas en la IgGh y el AcMrh en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX

Estructuras	% de estructuras encontradas en la IgGh y el AcMrh en los diferentes niveles de amplificación con MTX.						
	IgGh	0 MTX	100 MTX	200 MTX	400 MTX	800 MTX	1600 MTX
Altos en manosa	3.3	7.9	9.0	6.2	4.8	6.6	9.1
Complejos	96.7	89.8	89.5	93.8	92.8	93.4	88.1
G0	16.4	51.9	45.2	65.8	66.8	61.0	56.0
G1	26.7	22.6	23.4	19.6	18.8	24.0	21.8
G2	36.9	14.3	19.2	8.3	7.2	8.3	10.3
Fucosilados	64.2	81.7	79.0	88.5	87.2	88.1	80.7

De acuerdo a lo observado en la **Figura 17** y la **Tabla 3** los perfiles de glicosilación del AcMrh en las diferentes condiciones de amplificación, mostraron una mayor proporción de la forma bi-antenaria a-galactosilada (G0) en comparación con la IgGh lo anterior corresponde con lo reportado por Wacker et al. (2011). Albrecht et al. (2014) relacionan este fenómeno a que las células CHO presentan una baja tasa de galactosilación.

En los niveles de amplificación con 200, 400 y 800 de MTX, se observó un incremento promedio del 25% las estructuras G0 en comparación con lo obtenido en los niveles de 0 y 100 nM de MTX. Así mismo, en los niveles de amplificación de 200 a 800 nM de MTX se observó una disminución cercana al 50% de estructuras bi-galactosiladas en comparación con lo encontrado en los niveles de 0 y 100 nM de MTX, esto sugiere que el MTX tiene un impacto importante sobre la galactosilación del AcMrh.

Sin embargo, a 1600 nM de MTX la proporción de estructuras complejas G0, G1 y G2, mostraron porcentajes similares a los encontrados en los primeros niveles de amplificación (0 y 100 nM de MTX), es posible que la generación de otros mecanismos de resistencia al MTX permitieran que mejorase la calidad de la proteína en comparación con lo encontrado de 200 a 800 nM de MTX.

A pesar de las diferencias encontradas en la proporción de estructuras digalactosiladas (G2) del AcMrh, entre las diferentes condiciones de amplificación con MTX, estas fueron en promedio de 2 a 3 veces menor que lo encontrado en IgGh, esto es similar a lo encontrado por Wacker et al. (2011).

Así mismo, se observó que el AcMrh posee en promedio un 20% más de estructuras fucosiladas que la IgGh, diferentes estudios relacionan a este azúcar con una menor actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) (Hossler, et al., 2009; Albrecht et al., 2014).

De acuerdo a lo observado en el cromatograma de glicosilación de la IgGh (**Figura 16**), las estructuras ubicadas a partir de las 8.8 unidades de glucosa corresponden a estructuras sializadas y multiantenarias que no se encontraron en el AcMrh producido por la línea celular en las diferentes condiciones de amplificación.

La presencia estructuras sializadas en los anticuerpos monoclonales, esta relacionada con un mayor tiempo de vida media en circulación (Hossler et al., 2009). Estructuras complejas agalactosiladas (G0) están relacionadas con padecimientos como la artritis reumatoide y otros desordenes auto-inmunes, en base a que la deficiencia de galactosas terminales en las glicoproteínas tipo IgG1 puede activar la cascada del complemento, mientras que la adición de galactosas disminuye este potencial (Barrios et al., 2015)

## **11. CONCLUSIONES**

Se adaptó la línea celular CHO DG44 ATCC PTA 3356 a medio químicamente definido CD Opti CHO suplementado con 8 mM de glutamina y antibiótico.

Se implementó un inmunoensayo (ELISA) que permite cuantificar el AcMrh producido en cultivo.

Se determinó el comportamiento cinético de crecimiento, consumo y producción de metabolitos de la línea celular CHO DG44 PTA 3356 así como la producción de AcMrh producido, en todas las concentraciones de amplificación con MTX (0 a 1600 nM de MTX).

Se observó que debido al estrés generado por la exposición a concentraciones crecientes de MTX hubo una tendencia a disminuir la velocidad específica de crecimiento de 0 a 800 nM de MTX, aunque también se observó una recuperación de la velocidad de crecimiento a 1600 nM de MTX.

A 1600 nM de MTX se observó una disminución significativa de la velocidad de producción de lactato con respecto a los cultivos sin amplificación, sin embargo, no se observaron cambios en la velocidad de consumo de glucosa.

Con respecto a la producción de AcMrh, a 200 nM se observó un aumento de aproximadamente 6 veces la velocidad específica de producción de anticuerpo con respecto al nivel sin amplificación con MTX y se alcanzaron concentraciones máximas de AcMrh casi 7 veces mayores que el cultivo sin MTX.

En los niveles de amplificación con 800 y 1600 nM de MTX aunque la velocidad de producción de AcMrh fue menor que la obtenida a 200 nM de MTX, se alcanzaron concentraciones máximas de 600 y 850 mg/L, es decir, entre 1.5 y 2 veces más que la concentración máxima de AcMrh alcanzada en 200 nM de MTX. Así mismo, en los cultivos a 800 y 1600 nM de MTX las velocidades de producción fueron de 3 a 4 veces mayores que los cultivos sin MTX y se alcanzaron concentraciones máximas de AcMrh de 9 a 12 veces mayores con respecto al cultivo sin MTX.

No se observaron cambios en la velocidad de consumo de glutamina en las diferentes concentraciones de amplificación con MTX.

Con respecto a la glicosilación del AcMrh producido por la línea celular en los diferentes niveles de amplificación con MTX, en los niveles de amplificación de

200, 400 y 800 nM de MTX, se determinó una disminución de las formas di-galactosiladas y el incremento en las formas a-galactosiladas en comparación con lo determinado en los niveles anteriores de amplificación con 0 y 100 nM de MTX. Así mismo, se observó que el AcMrh producido por la línea celular CHO DG44 presenta en su perfil estructuras similares a lo encontrado en el ser humano, aunque, el perfil de N-glicosilación del AcMrh mostró en general una mayor proporción de estructuras a-galactosiladas, así como una mayor proporción de estructuras fucosiladas en comparación con lo encontrado en la IgGh. Además, en el AcMrh no se encontraron estructuras multiantenarias y sialidades producidas en humano.

## **12. ANEXO I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

**Estadísticas descriptivas:** Concentración cel viable máxima ( $1 \times 10^6$  cel/mL),  $\mu$  ( $h^{-1}$ ), qGlc (pmol/cel/h), qLac (pmol/cel/h), qGln (pmol/cel/h), qAcMrh (pg/cel/h), YLac/Glc y concentración máxima de AcMrh en cultivo de la línea celular CHO DG44 PTA 3356 en las diferentes condiciones de amplificación con MTX.

Variable	MTX	Media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar	Mínimo	Máximo
Conc. cel	0	1.715	0.206	0.042	12.02	1.480	1.865
	100	2.260	0.570	0.325	25.23	1.680	2.820
	200	2.070	0.389	0.152	18.81	1.705	2.480
	400	1.940	0.227	0.052	11.71	1.680	2.100
	800	1.9175	0.00354	0.00001	0.18	1.9150	1.9200
	1600	2.724	0.368	0.136	13.52	2.464	2.985
Vel. cre	0	0.03083	0.00204	0.00000	6.62	0.02860	0.03260
	100	0.02963	0.00375	0.00001	12.66	0.02580	0.03330
	200	0.028067	0.001595	0.000003	5.68	0.027000	0.029900
	400	0.02363	0.00256	0.00001	10.82	0.02070	0.02540
	800	0.02120	0.00467	0.00002	22.01	0.01790	0.02450
	1600	0.02455	0.00262	0.00001	10.66	0.02270	0.02640
qGlc	0	0.2312	0.0217	0.0005	9.39	0.2087	0.2520
	100	0.2353	0.0348	0.0012	14.79	0.2050	0.2733
	200	0.18458	0.01492	0.00022	8.08	0.17228	0.20118
	400	0.1917	0.0290	0.0008	15.10	0.1691	0.2243
	800	0.25996	0.00928	0.00009	3.57	0.25340	0.26653
	1600	0.19762	0.00275	0.00001	1.39	0.19568	0.19957
qLac	0	0.3757	0.0209	0.0004	5.56	0.3516	0.3890
	100	0.2833	0.0864	0.0075	30.49	0.1878	0.3560
	200	0.3326	0.0271	0.0007	8.16	0.3013	0.3483
	400	0.2602	0.0396	0.0016	15.21	0.2156	0.2910
	800	0.3370	0.0372	0.0014	11.04	0.3107	0.3633
	1600	0.2028	0.0180	0.0003	8.88	0.1901	0.2156
qGln	0	0.0990	0.0303	0.0009	30.63	0.0640	0.1171
	100	0.09609	0.01137	0.00013	11.84	0.08308	0.10413
	200	0.08519	0.00410	0.00002	4.82	0.08080	0.08893
	400	0.0941	0.0259	0.0007	27.48	0.0648	0.1135
	800	0.11223	0.000304	0.000000	0.27	0.11202	0.11245
	1600	0.07788	0.00260	0.00001	3.34	0.07605	0.07972
qAcMrh	0	0.964	0.454	0.206	47.07	0.448	1.303
	100	2.124	0.668	0.446	31.44	1.419	2.747
	200	5.990	1.641	2.692	27.39	4.979	7.883
	400	1.409	0.544	0.296	38.63	1.024	1.794
	800	2.872	1.359	1.846	47.30	1.912	3.833
	1600	4.61	2.52	6.33	54.61	2.83	6.39
YLac/Glc	0	1.6294	0.0754	0.0057	4.63	1.5436	1.6851
	100	1.256	0.530	0.281	42.21	0.687	1.737
	200	1.8040	0.1111	0.0123	6.16	1.7314	1.9319
	400	1.3604	0.1296	0.0168	9.53	1.2746	1.5095
	800	1.2946	0.0969	0.0094	7.49	1.2261	1.3632
	1600	1.0270	0.1054	0.0111	10.26	0.9525	1.1015

AcMrh máx.	0	68.58	14.44	208.44	21.05	52.05	78.72
	100	189.23	11.97	143.16	6.32	175.44	196.86
	200	466.42	13.63	185.65	2.92	457.67	482.12
	400	504	212	44785	42.01	354	653
	800	606.0	24.7	609.0	4.07	588.5	623.4
	1600	858	207	42867	24.13	712	1004

## ANOVA unidireccional: Conc. cel vs. MTX

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0.05$   
 Filas no utilizadas       1

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
MTX	6	0, 100, 200, 400, 800, 1600

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MTX	5	1.439		52.98%	1.439	0.2879	2.25	0.128
Error	10	1.278		47.02%	1.278	0.1278		
Total	15	2.717		100.00%				

### Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
0.357440		52.98%	29.47%	3.11221	0.00%

### Medias

MTX	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	1.715	0.206	( 1.255, 2.175)
100	3	2.260	0.570	( 1.800, 2.720)
200	3	2.070	0.389	( 1.610, 2.530)
400	3	1.940	0.227	( 1.480, 2.400)
800	2	1.9175	0.00354	(1.35434, 2.48066)
1600	2	2.724	0.368	( 2.161, 3.288)

Desv.Est. agrupada = 0.357440

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

MTX	N	Media	Agrupación
1600	2	2.724	A
100	3	2.260	A
200	3	2.070	A
400	3	1.940	A
800	2	1.91750	A
0	3	1.715	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100 - 0	0.545	0.292	(-0.468, 1.558)	1.87	0.470
200 - 0	0.355	0.292	(-0.658, 1.368)	1.22	0.820
400 - 0	0.225	0.292	(-0.788, 1.238)	0.77	0.967
800 - 0	0.202	0.326	(-0.930, 1.335)	0.62	0.987
1600 - 0	1.009	0.326	(-0.123, 2.142)	3.09	0.089
200 - 100	-0.190	0.292	(-1.203, 0.823)	-0.65	0.984
400 - 100	-0.320	0.292	(-1.333, 0.693)	-1.10	0.872
800 - 100	-0.342	0.326	(-1.475, 0.790)	-1.05	0.890
1600 - 100	0.465	0.326	(-0.668, 1.597)	1.42	0.714
400 - 200	-0.130	0.292	(-1.143, 0.883)	-0.45	0.997
800 - 200	-0.153	0.326	(-1.285, 0.980)	-0.47	0.996
1600 - 200	0.654	0.326	(-0.478, 1.787)	2.01	0.401
800 - 400	-0.023	0.326	(-1.155, 1.110)	-0.07	1.000
1600 - 400	0.784	0.326	(-0.348, 1.917)	2.40	0.241
1600 - 800	0.807	0.357	(-0.434, 2.048)	2.26	0.293

Nivel de confianza individual = 99.40%

**ANOVA unidireccional: Vel. cre vs. MTX**

Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0.05$   
 Filas no utilizadas      1

Información del factor

Factor Niveles Valores  
 MTX            6    0, 100, 200, 400, 800, 1600

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MTX	5	0.000181	68.44%	0.000181	0.000036	4.34	0.023
Error	10	0.000083	31.56%	0.000083	0.000008		
Total	15	0.000264	100.00%				

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
0.0028860	68.44%	52.65%	0.0002375	10.00%

Medias

MTX	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	0.03083	0.00204	( 0.02712, 0.03455)
100	3	0.02963	0.00375	( 0.02592, 0.03335)
200	3	0.028067	0.001595	(0.024354, 0.031779)
400	3	0.02363	0.00256	( 0.01992, 0.02735)
800	2	0.02120	0.00467	( 0.01665, 0.02575)
1600	2	0.02455	0.00262	( 0.02000, 0.02910)

Desv.Est. agrupada = 0.00288603

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

MTX	N	Media	Agrupación
0	3	0.03083	A
100	3	0.02963	A B
200	3	0.028067	A B
1600	2	0.02455	A B
400	3	0.02363	A B
800	2	0.02120	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100 - 0	-0.00120	0.00236	(-0.00938, 0.00698)	-0.51	0.995
200 - 0	-0.00277	0.00236	(-0.01095, 0.00541)	-1.17	0.839
400 - 0	-0.00720	0.00236	(-0.01538, 0.00098)	-3.06	0.094
800 - 0	-0.00963	0.00263	(-0.01878, -0.00049)	-3.66	0.038
1600 - 0	-0.00628	0.00263	(-0.01543, 0.00286)	-2.38	0.247
200 - 100	-0.00157	0.00236	(-0.00975, 0.00661)	-0.66	0.982
400 - 100	-0.00600	0.00236	(-0.01418, 0.00218)	-2.55	0.198
800 - 100	-0.00843	0.00263	(-0.01758, 0.00071)	-3.20	0.076
1600 - 100	-0.00508	0.00263	(-0.01423, 0.00406)	-1.93	0.439
400 - 200	-0.00443	0.00236	(-0.01261, 0.00375)	-1.88	0.463
800 - 200	-0.00687	0.00263	(-0.01601, 0.00228)	-2.61	0.182
1600 - 200	-0.00352	0.00263	(-0.01266, 0.00563)	-1.33	0.761
800 - 400	-0.00243	0.00263	(-0.01158, 0.00671)	-0.92	0.931
1600 - 400	0.00092	0.00263	(-0.00823, 0.01006)	0.35	0.999
1600 - 800	0.00335	0.00289	(-0.00667, 0.01337)	1.16	0.845

Nivel de confianza individual = 99.40%

## ANOVA unidireccional: qGlc vs. MTX

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
Filas no utilizadas	1

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
MTX	6	0, 100, 200, 400, 800, 1600

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MTX	5	0.011072	66.50%	0.011072	0.002214	3.97	0.030
Error	10	0.005579	33.50%	0.005579	0.000558		
Total	15	0.016650	100.00%				

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
0.0236190	66.50%	49.74%	0.0127158	23.63%

Medias

MTX	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	0.2312	0.0217	( 0.2008, 0.2616)
100	3	0.2353	0.0348	( 0.2049, 0.2657)
200	3	0.18458	0.01492	(0.15419, 0.21496)
400	3	0.1917	0.0290	( 0.1613, 0.2221)
800	2	0.25996	0.00928	(0.22275, 0.29717)
1600	2	0.19762	0.00275	(0.16041, 0.23484)

Desv.Est. agrupada = 0.0236190

**Comparaciones en parejas de Tukey**

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

MTX	N	Media	Agrupación
800	2	0.25996	A
100	3	0.2353	A B
0	3	0.2312	A B
1600	2	0.19762	A B
400	3	0.1917	A B
200	3	0.18458	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100 - 0	0.0041	0.0193	(-0.0629, 0.0711)	0.21	1.000
200 - 0	-0.0466	0.0193	(-0.1135, 0.0204)	-2.42	0.237
400 - 0	-0.0395	0.0193	(-0.1064, 0.0275)	-2.05	0.382
800 - 0	0.0288	0.0216	(-0.0461, 0.1037)	1.34	0.761
1600 - 0	-0.0335	0.0216	(-0.1084, 0.0413)	-1.56	0.641
200 - 100	-0.0507	0.0193	(-0.1176, 0.0163)	-2.63	0.176
400 - 100	-0.0436	0.0193	(-0.1105, 0.0234)	-2.26	0.292
800 - 100	0.0247	0.0216	(-0.0502, 0.0996)	1.15	0.852
1600 - 100	-0.0376	0.0216	(-0.1125, 0.0372)	-1.75	0.535
400 - 200	0.0071	0.0193	(-0.0599, 0.0741)	0.37	0.999
800 - 200	0.0754	0.0216	( 0.0005, 0.1502)	3.50	0.048
1600 - 200	0.0130	0.0216	(-0.0618, 0.0879)	0.61	0.988
800 - 400	0.0683	0.0216	(-0.0066, 0.1431)	3.17	0.080
1600 - 400	0.0059	0.0216	(-0.0689, 0.0808)	0.28	1.000
1600 - 800	-0.0623	0.0236	(-0.1443, 0.0197)	-2.64	0.173

Nivel de confianza individual = 99.40%

## ANOVA unidireccional: qLac vs. MTX

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna        Por lo menos una media es diferente  
Nivel de significancia    $\alpha = 0.05$   
Filas no utilizadas      1

### Información del factor

Factor   Niveles   Valores  
MTX            6   0, 100, 200, 400, 800, 1600

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MTX	5	0.04751		68.25%	0.04751	0.009502	4.30	0.024
Error	10	0.02210		31.75%	0.02210	0.002210		
Total	15	0.06961		100.00%				

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
0.0470119	68.25%	52.38%	0.0527191	24.27%

### Medias

MTX	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	0.3757	0.0209	(0.3152, 0.4361)
100	3	0.2833	0.0864	(0.2228, 0.3438)
200	3	0.3326	0.0271	(0.2721, 0.3931)
400	3	0.2602	0.0396	(0.1997, 0.3207)
800	2	0.3370	0.0372	(0.2629, 0.4111)
1600	2	0.2028	0.0180	(0.1287, 0.2769)

Desv.Est. agrupada = 0.0470119

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

MTX	N	Media	Agrupación
0	3	0.3757	A
800	2	0.3370	A B
200	3	0.3326	A B
100	3	0.2833	A B
400	3	0.2602	A B
1600	2	0.2028	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100 - 0	-0.0924	0.0384	(-0.2257, 0.0409)	-2.41	0.240
200 - 0	-0.0431	0.0384	(-0.1763, 0.0902)	-1.12	0.862
400 - 0	-0.1155	0.0384	(-0.2487, 0.0178)	-3.01	0.101
800 - 0	-0.0387	0.0429	(-0.1877, 0.1103)	-0.90	0.938
1600 - 0	-0.1729	0.0429	(-0.3218, -0.0239)	-4.03	0.022
200 - 100	0.0493	0.0384	(-0.0839, 0.1826)	1.29	0.787
400 - 100	-0.0231	0.0384	(-0.1563, 0.1102)	-0.60	0.989
800 - 100	0.0537	0.0429	(-0.0953, 0.2027)	1.25	0.803
1600 - 100	-0.0805	0.0429	(-0.2295, 0.0685)	-1.87	0.466
400 - 200	-0.0724	0.0384	(-0.2057, 0.0609)	-1.89	0.461
800 - 200	0.0044	0.0429	(-0.1446, 0.1534)	0.10	1.000
1600 - 200	-0.1298	0.0429	(-0.2788, 0.0192)	-3.02	0.099
800 - 400	0.0768	0.0429	(-0.0722, 0.2258)	1.79	0.511
1600 - 400	-0.0574	0.0429	(-0.2064, 0.0916)	-1.34	0.760
1600 - 800	-0.1342	0.0470	(-0.2974, 0.0290)	-2.85	0.127

Nivel de confianza individual = 99.40%

**ANOVA unidireccional: qGln vs. MTX**

Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0.05$   
 Filas no utilizadas      1

Información del factor

Factor Niveles Valores  
 MTX            6    0, 100, 200, 400, 800, 1600

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MTX	5	0.001504	30.20%	0.001504	0.000301	0.87	0.536
Error	10	0.003475	69.80%	0.003475	0.000348		
Total	15	0.004979	100.00%				

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
0.0186422	30.20%	0.00%	0.0078314	0.00%

Medias

MTX	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	0.0990	0.0303	( 0.0750, 0.1229)
100	3	0.09609	0.01137	( 0.07211, 0.12007)
200	3	0.08519	0.00410	( 0.06121, 0.10918)
400	3	0.0941	0.0259	( 0.0702, 0.1181)
800	2	0.112232	0.000304	(0.082860, 0.141603)
1600	2	0.07788	0.00260	( 0.04851, 0.10726)

Desv.Est. agrupada = 0.0186422

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

MTX	N	Media	Agrupación
800	2	0.112232	A
0	3	0.0990	A
100	3	0.09609	A
400	3	0.0941	A
200	3	0.08519	A
1600	2	0.07788	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100 - 0	-0.0029	0.0152	(-0.0557, 0.0500)	-0.19	1.000
200 - 0	-0.0138	0.0152	(-0.0666, 0.0391)	-0.90	0.937
400 - 0	-0.0048	0.0152	(-0.0577, 0.0480)	-0.32	0.999
800 - 0	0.0133	0.0170	(-0.0458, 0.0724)	0.78	0.965
1600 - 0	-0.0211	0.0170	(-0.0802, 0.0380)	-1.24	0.809
200 - 100	-0.0109	0.0152	(-0.0637, 0.0420)	-0.72	0.976
400 - 100	-0.0019	0.0152	(-0.0548, 0.0509)	-0.13	1.000
800 - 100	0.0161	0.0170	(-0.0429, 0.0752)	0.95	0.924
1600 - 100	-0.0182	0.0170	(-0.0773, 0.0409)	-1.07	0.883
400 - 200	0.0089	0.0152	(-0.0439, 0.0618)	0.59	0.990
800 - 200	0.0270	0.0170	(-0.0320, 0.0861)	1.59	0.622
1600 - 200	-0.0073	0.0170	(-0.0664, 0.0518)	-0.43	0.998
800 - 400	0.0181	0.0170	(-0.0410, 0.0772)	1.06	0.885
1600 - 400	-0.0163	0.0170	(-0.0753, 0.0428)	-0.96	0.922
1600 - 800	-0.0343	0.0186	(-0.0991, 0.0304)	-1.84	0.483

Nivel de confianza individual = 99.40%

## ANOVA unidireccional: qAcMrh vs. MTX

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
Filas no utilizadas	2

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
MTX	6	0, 100, 200, 400, 800, 1600

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MTX	5	51.81	77.36%	51.81	10.361	6.15	0.010
Error	9	15.16	22.64%	15.16	1.684		
Total	14	66.97	100.00%				

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
1.29786	77.36%	64.79%	48.9337	26.93%

Medias

MTX	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	0.964	0.454	(-0.731, 2.659)
100	3	2.124	0.668	( 0.429, 3.820)
200	3	5.990	1.641	( 4.295, 7.685)
400	2	1.409	0.544	(-0.667, 3.485)
800	2	2.872	1.359	( 0.796, 4.948)
1600	2	4.61	2.52	( 2.53, 6.68)

Desv.Est. agrupada = 1.29786

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

MTX	N	Media	Agrupación
200	3	5.990	A
1600	2	4.61	A B
800	2	2.872	A B
100	3	2.124	B
400	2	1.409	B
0	3	0.964	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100 - 0	1.16	1.06	(-2.60, 4.92)	1.09	0.872
200 - 0	5.03	1.06	( 1.26, 8.79)	4.74	0.010
400 - 0	0.45	1.18	(-3.76, 4.65)	0.38	0.999
800 - 0	1.91	1.18	(-2.30, 6.11)	1.61	0.612
1600 - 0	3.64	1.18	(-0.56, 7.85)	3.07	0.099
200 - 100	3.87	1.06	( 0.10, 7.63)	3.65	0.044
400 - 100	-0.72	1.18	(-4.92, 3.49)	-0.60	0.988
800 - 100	0.75	1.18	(-3.46, 4.95)	0.63	0.985
1600 - 100	2.48	1.18	(-1.72, 6.69)	2.10	0.367
400 - 200	-4.58	1.18	(-8.79, -0.37)	-3.87	0.032
800 - 200	-3.12	1.18	(-7.32, 1.09)	-2.63	0.184
1600 - 200	-1.38	1.18	(-5.59, 2.82)	-1.17	0.841
800 - 400	1.46	1.30	(-3.14, 6.07)	1.13	0.859
1600 - 400	3.20	1.30	(-1.41, 7.80)	2.46	0.230
1600 - 800	1.73	1.30	(-2.87, 6.34)	1.34	0.760

Nivel de confianza individual = 99.38%

## ANOVA unidireccional: YLac/Glc vs. MTX

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna        Por lo menos una media es diferente  
Nivel de significancia    $\alpha = 0.05$   
Filas no utilizadas      1

### Información del factor

Factor   Niveles   Valores  
MTX            6   0, 100, 200, 400, 800, 1600

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MTX	5	1.0050	60.63%	1.0050	0.20099	3.08	0.061
Error	10	0.6525	39.37%	0.6525	0.06525		
Total	15	1.6575	100.00%				

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. PRESS	R-cuad. (pred)
0.255448	60.63%	40.95%	1.50408	9.26%

### Medias

MTX	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	1.6294	0.0754	(1.3008, 1.9580)
100	3	1.256	0.530	(0.928, 1.585)
200	3	1.8040	0.1111	(1.4754, 2.1326)
400	3	1.3604	0.1296	(1.0318, 1.6890)
800	2	1.2946	0.0969	(0.8922, 1.6971)
1600	2	1.0270	0.1054	(0.6245, 1.4295)

Desv.Est. agrupada = 0.255448

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

MTX	N	Media	Agrupación
200	3	1.8040	A
0	3	1.6294	A
400	3	1.3604	A
800	2	1.2946	A
100	3	1.256	A
1600	2	1.0270	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100 - 0	-0.373	0.209	(-1.097, 0.351)	-1.79	0.512
200 - 0	0.175	0.209	(-0.550, 0.899)	0.84	0.953
400 - 0	-0.269	0.209	(-0.993, 0.455)	-1.29	0.784
800 - 0	-0.335	0.233	(-1.144, 0.475)	-1.44	0.708
1600 - 0	-0.602	0.233	(-1.412, 0.207)	-2.58	0.188
200 - 100	0.548	0.209	(-0.176, 1.272)	2.63	0.177
400 - 100	0.104	0.209	(-0.620, 0.828)	0.50	0.995
800 - 100	0.038	0.233	(-0.771, 0.848)	0.16	1.000
1600 - 100	-0.229	0.233	(-1.039, 0.580)	-0.98	0.913
400 - 200	-0.444	0.209	(-1.168, 0.281)	-2.13	0.346
800 - 200	-0.509	0.233	(-1.319, 0.300)	-2.18	0.322
1600 - 200	-0.777	0.233	(-1.587, 0.033)	-3.33	0.062
800 - 400	-0.066	0.233	(-0.875, 0.744)	-0.28	1.000
1600 - 400	-0.333	0.233	(-1.143, 0.476)	-1.43	0.711
1600 - 800	-0.268	0.255	(-1.155, 0.619)	-1.05	0.891

Nivel de confianza individual = 99.40%

**ANOVA unidireccional: AcMrh máx. vs. MTX**

Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0.05$   
 Filas no utilizadas       2

Información del factor

Factor   Niveles   Valores  
 MTX            6   0, 100, 200, 400, 800, 1600

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
MTX	5	1001127	91.81%	1001127	200225	20.17	0.000
Error	9	89335	8.19%	89335	9926		
Total	14	1090462	100.00%				

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
99.6299	91.81%	87.26%	355460	67.40%

Medias

MTX	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
0	3	68.58	14.44	(-61.54, 198.70)
100	3	189.23	11.97	( 59.11, 319.35)
200	3	466.42	13.63	(336.30, 596.54)
400	2	504	212	( 344, 663)
800	2	606.0	24.7	( 446.6, 765.3)
1600	2	858	207	( 699, 1017)

Desv.Est. agrupada = 99.6299

## Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

MTX	N	Media	Agrupación
1600	2	858	A
800	2	606.0	A B
400	2	504	B C
200	3	466.42	B C
100	3	189.23	C D
0	3	68.58	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
100 - 0	120.7	81.3	(-168.1, 409.4)	1.48	0.682
200 - 0	397.8	81.3	( 109.1, 686.6)	4.89	0.008
400 - 0	435.1	90.9	( 112.3, 758.0)	4.78	0.009
800 - 0	537.4	90.9	( 214.6, 860.2)	5.91	0.002
1600 - 0	789.4	90.9	( 466.6, 1112.3)	8.68	0.000
200 - 100	277.2	81.3	( -11.6, 565.9)	3.41	0.062
400 - 100	314.5	90.9	( -8.4, 637.3)	3.46	0.057
800 - 100	416.8	90.9	( 93.9, 739.6)	4.58	0.012
1600 - 100	668.8	90.9	( 345.9, 991.6)	7.35	0.000
400 - 200	37.3	90.9	(-285.6, 360.1)	0.41	0.998
800 - 200	139.6	90.9	(-183.3, 462.4)	1.53	0.654
1600 - 200	391.6	90.9	( 68.7, 714.4)	4.31	0.017
800 - 400	102.3	99.6	(-251.4, 455.9)	1.03	0.898
1600 - 400	354.3	99.6	( 0.6, 707.9)	3.56	0.050
1600 - 800	252.0	99.6	(-101.6, 605.7)	2.53	0.211

Nivel de confianza individual = 99.38%

### **13. REFERENCIAS**

- Agrawal V., Bal. (2012) Strategies for rapid production of therapeutic proteins in mammalian cells. *BioProcess international* 10(4). 32-48.
- Albretch, S., Hilliard, M., Rudd, P., (2014) Therapeutic proteins. Facing the challenges of glycobiology. *Journal of Health Policy & Outcomes Research JHPOR*). Doi:10.7365/JHPOR.2014,1, 12-17.
- Bandaranayake, A., Almo, S. (2013). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters*, 588, 253-260.
- Barrios, C., Zierer, J., Gudelj, I., Stambuk, J., Ugrina, I., Rodríguez, E., Soler M.J., Pavic, T., Simurina, M., Keser, T., Pucic-Bakovic, M., Mangino, M., Pascual, J., Spector, T., Lauc, G., Menni, C. (2015) Glycosylation Profile of IgG in Moderate Kidney Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*. Doi:10.1681/ASN.2015010109.
- Brezinsky, S., Chiang, G., Szilvasi, A., Mohan, S., Shapiro, R., MacLean, A., Sisk, W., Thill, G. (2003). A simple method for enriching populations of transfected CHO cells of higher specific productivity. *Journal of immunological methods* 277. 141-155.
- Cacciatore, J., Chasin, L., Leonard, E. (2010). Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnology Advances*, 28, 673-681
- Cacciatore, J., Leonard, E., Chasin, L. (2012). The isolation of CHO cells with a site conferring a high and reproducible transgene amplification rate. *Journal of Biotechnology*, 164, 346-353.
- Chusainow, J., Yang, Y., HM Yeo, J., Toh, P., Asvadi, P., SC Wong, N., GS Yap, M. (2009) A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable High producer?. *Biotechnology and bioengineering* 102. 1182-1196.

- De Jesus, M., Wurm, F. (2011) Manufacturing recombinant proteins in Kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78. 184-188.
- Gódia, F., Cairó, J. (2006) Cell Metabolism (p. 81-106) Ozturk, WS. Hu. Cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies. USA. Taylor & Francis.
- Harcum, S. (2006) Protein Glycosylation (p. 113-153) Ozturk, WS. Hu. Cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies. USA. Taylor & Francis.
- Hossler, P., Khattak, S., Jian Li, Z. (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* (19). 936-949.
- Jiang, Z., Huang, Y., Sharfstein, S. (2006) Regulation of Recombinant Monoclonal Antibody Production in Chinese Hamster Ovary Cells: A Comparative Study of Gene Copy Number, mRNA Level, and Protein Expression. *Biotechnology Progress* 22. 313-318.
- Jianwei Z. (2012) Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances* 30.1158-1170
- Kim, J., Kim Y., Lee, G. (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potencial. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93. 917-930
- Lao, M., Toth, D. (1997) Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture. *Biotechnol. Prog.* (13). 688-691
- Lipscomb, M., Palomares, A., Hernández, V., Ramírez, O., Kompala, D. (2005) Effect of Production Method and Gene Amplification on the Glycosylation Pattern of a Secreted Reporter Protein in CHO Cells. *Biotechnol. Prog.* (21). 40-49.

- Noh S., Sathyamurthy M., Lee G. (2013) Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. *Current Opinion in Chemical Engineering*. <http://dx.doi.org/101016/j.coche.2013.08.002>
- Omasa, T. (2002) Gene amplification and its application in cell and tissue engineering. *Journal of bioscience and bioengineering* 94(6). 600-605
- Serrato, A., Palomares, L., Meneses, A., Ramírez, T. (2004) Heterogeneous Conditions in Dissolved Oxygen Affect N-Glycosylation but Not Productivity of a Monoclonal Antibody in Hybridoma Cultures. *Biotechnology and Bioengineering* (88)2. 176-188.
- Seung, C., Min, S., Jong, Y., Sun, O., Gyun, M. (2005) Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 162-169
- Shen, A., Van de Goor, J., Zheng, L., Reyes, A., Krummen, L. (2006) Recombinant DNA technology and cell line development (p. 15-30) S. Ozturk, WS. Hu. Cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies. USA. Taylor & Francis.
- Tsao, Y., Cardoso, A., Condon, R., Voloch, M., Lio, P., Lagos, J., Kearns, B., Liu, Z. (2005). Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 118. 316-327.
- Unified Medical Language System. National Library of Medicine. <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=geneamplification>. Mayo 9, 2015 (15:00h).
- Urlaub, G., Chasin, L. (1980) Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 77(7). 4216-4240.

- Wacker, C., Berger, C., Girard, P., Meier, R. (2011). Glycosylation profiles of therapeutic antibody pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79. 503-507.
- Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Ogura, Y., Oi, D., Omasa, T. Katakura, Y., Kishimoto, M., Suga, K. (2000) Amplified Gene Location in Chromosomal DNA Affected Recombinant Protein Production and Stability of Amplified Genes. *Biotechnology Progress* 16. 710-715.
- Zagari, F. (2012) Multidisciplinary Análisis of the Metabolic Shift to Lactate Consumption in CHO Cell Culture. Tesis de doctorado en ciencias. Escuela politécnica federal de Lausanne, Suiza.