



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO EN PERFUSIÓN DE CÉLULAS CHO  
COMO OPCIÓN PARA INTENSIFICAR Y FACILITAR EL ESCALAMIENTO DE LA  
PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
Michelle Lara Mejía**

**TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich  
Instituto de Biotecnología UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dr. Leobardo Serrano Carreón  
Instituto de Biotecnología UNAM**

**Dr. Álvaro Raúl Lara Rodríguez  
Universidad Autónoma Metropolitana, UAM**

**Cuernavaca, Morelos, noviembre 2023**



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.

La investigación reportada en esta tesis se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos en el consorcio de los Doctores Octavio Tonatihu Ramírez Reivich y Laura Alicia Palomares Aguilera del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la dirección del Dr. Octavio Tonatihu Ramírez Reivich.

Investigación realizada gracias al apoyo y financiamiento de Laboratorios Liomont S. A de C.V. P-10608 y P-10843. Se contó con una beca para estudios de posgrado CONACyT CVU 1101030

## **AGRADECIMIENTOS**

TUTOR PRINCIPAL:

**Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich**

LÍDERES ACADÉMICOS:

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, Dra. Laura Alicia Palomares Ramírez

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Álvaro Raúl Lara Rodríguez

Dr. Leobardo Serrano Carreón

LABORATORIOS LIOMONT S.A DE C.V

Dr. Sergio Valentinotti Marelli

M. en C. María Alejandra Cruz

TÉCNICOS ACADÉMICOS:

M. en C. Vanessa Hernández Rodríguez

M. en C. Martha Alicia Contreras Ordóñez

M. en C. Ana Ruth Pastor Flores

APOYO TÉCNICO:

Ing. Alberto Porras Sanjuanico

M. en C. Alfonso Gómez Aguirre

M. en C. Emiliano Balderas Ramírez

Laboratorio Nacional para la Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos  
Biotecnológicos (LAMMB)

Dra. Mabel Rodríguez González

Lic. Marisela Olvera Rodríguez

JURADO DE EXAMEN:

Dr. Jesús Martínez Barnetche

Dra. Marcela Ayala Aceves

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Dr. Sergio Valentinotti Marelli

Dra. Norma Adriana Valdéz Cruz

DOCENCIA:

José Antonio Bolaños Guillen

Ernesto Ortíz Suri

LABORATORIO 10 GPR:

Karin Christiane Levy Popp

María Guadalupe Paredes Valdez

## DEDICATORIA

A mi mami Elodia Mejía que amo con todo mi corazón, gracias por darme alas para volar, apoyarme en cada paso que doy, ser mi pilar y mi refugio y amarme incondicionalmente. Todos mis logros son por y para ti mami, te amo.

A mis abuelitos, Salomé y Martín que siempre me han apoyado en todas mis decisiones y querido por encima de todo, y aunque Harris ya no esté presente en vida, siempre estará en mi corazón.

A mis mejores amigos, Mariana Malvaiz y Gerardo Martínez, que del otro lado del mundo siempre han estado para animarme y apapacharme cuando lo necesito, en las buenas y en las peores. Gracias por su amistad todos estos años, los amo best.

A mis amigas incondicionales Analaura Gómez y Mayra Sánchez que festejan cada uno de mis logros como si fueran suyos y que han estado para mi en los momentos más felices y también en los más duros, gracias por esa amistad tan bonita, me dan años de vida, las amo.

A Monserrat Carmona quien siempre ha estado al pendiente de mi y ha sido un pilar emocional enorme para mí, te quiero mucho Cabo.

A mis roomies Jorge Campano, Kenya Romero y Rogelio Morales que me han acompañado en este camino como mi segunda familia y los quiero como tal, gracias por aparecer en mi vida y ser mi pequeña Ohana en Cuernavaca, los quiero mucho.

A mis amigos de Laboratorio, Anayeli Martínez, Lidia B., Albert P., Andrea C., gracias por tantas risas y anécdotas, siempre escucharme, darme su sabia opinión para todo, y quererme mucho. Los quiero mucho amigos.

A los colegas del laboratorio Palomares-Ramírez Esteph, Jorge, Ana, César, Quetza, Juan Carlos R., Memo, Juan Carlos A., Michelle G, Wen, Rick, Paz, Danny y Ulises por sus grandes enseñanzas, de todos aprendí muchísimo, gracias por dejarme ser su padawan.

Por último, con todo mi cariño y amor, un enorme agradecimiento para mi novio y confidente Martín Ruiz, que siempre ha estado para mí, apoyándome, queriéndome, dándome palabras de aliento cuando son necesarias y celebrando mis logros, te amo con todo mi corazón bae.

From sprinkler splashes to fireplace ashes, I gave my blood, sweat, and tears for this [...] You've got no reason to  
be afraid

You're on your own, kid, you always have been

# Contenido

Índice de tablas .....	9
Índice de figuras .....	10
Símbolos y Abreviaturas .....	13
1. Resumen .....	15
2. Introducción .....	17
3. Antecedentes.....	19
3.1 Los cultivos continuos como opción de intensificación de bioprocesos .....	19
3.2 Dispositivos de retención celular para cultivos por perfusión en biorreactor	26
3.2.1 Separador acústico .....	27
3.2.2 Filtración de flujo tangencial (TFF).....	29
3.2.3 Filtración de flujo tangencial alternado (ATF) .....	29
3.3 Sistema de expresión de anticuerpos monoclonales .....	30
3.4 Calidad del anticuerpo monoclonal en cultivo continuo.....	31
3.4.1 N-glicosilación.....	32
3.4.2 Variantes de carga o Isoformas .....	37
4. Justificación .....	40
5. Hipótesis .....	40
6. Objetivo General.....	41
6.1 Objetivos específicos .....	41
7. Metodología.....	42
7.1 Línea celular y medio de cultivo .....	42
7.2 Banco Celular.....	42
7.3.1 Cultivos por lote alimentado y perfusión en matraces .....	43
7.3.2 Cultivos por perfusión en biorreactores instrumentados .....	44
7.4 Determinación de concentración celular, viabilidad y metabolitos .....	48
7.4.1 Concentración celular y viabilidad.....	48
7.4.2 Análisis de metabolitos .....	49
7.4.3 Cuantificación de anticuerpo monoclonal en muestras de cultivo por HPLC .....	49
7.5 Purificación y determinación de la calidad del AcM .....	50
7.5.1 Determinación del perfil de N-glicosilación .....	51



7.5.2 Determinación del perfil de variantes de carga .....	53
8. Resultados y discusión .....	54
8.1 Cultivos en modo lote alimentado y perfusión intermitente .....	54
8.1.1 Cultivos por perfusión en biorreactores instrumentados .....	61
8.2 Tasa de perfusión específica (CSPR) .....	62
8.3 Análisis de producción de anticuerpo monoclonal .....	66
8.3.1 Producción de anticuerpo monoclonal en cultivos en biorreactor .....	71
8.4 Parámetros cinéticos y estequiométricos .....	72
8.5 Calidad del anticuerpo monoclonal .....	85
8.5.1 Variantes de carga .....	85
8.5.2 Patrón de N-glicosilación .....	89
9. Conclusiones .....	95
10. Perspectivas .....	97
11. Referencias .....	98

## Índice de tablas

Tabla 1. Modificaciones más frecuentes que forman variantes ácidas y básicas de un AcM. Adaptado de (F. Torkashvand et. al, 2017). .....	38
Tabla 2 Parámetros para cultivos en biorreactor en perfusión .....	47
Tabla 3. Porcentaje promedio de recuperación celular después de la perfusión intermitente.....	55
Tabla 4. Tasa de perfusión específica promedio en el estado estacionario. ....	65
Tabla 5. Valores de cantidad total de anticuerpo monoclonal acumulado en el tiempo. ....	68
Tabla 6. Productividad diaria normalizados con respecto a lote alimentado. ....	69
Tabla 7. Velocidad específica de producción de anticuerpo monoclonal ( $q_p$ ) en cultivos por perfusión medio A y medio B y lote alimentado. Valores normalizados con respecto a lote alimentado.....	70
Tabla 8. Rendimiento de medio de cultivo por cantidad de AcM producida. Los datos se encuentran normalizados con respecto al lote alimentado. ....	70
Tabla 9. Rendimientos en el estado estacionario normalizados con respecto a lote alimentado. Los valores de $\pm$ indican las desviaciones estándar de cada rendimiento en el estado estacionario.....	80
Tabla 10. Velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos y anticuerpo monoclonal. Los valores de +/- representan las desviaciones estándar de cada velocidad en el estado estacionario. Los valores se encuentran normalizados con respecto a lote alimentado. ....	82
Tabla 11. Distribución de variante de cargas normalizadas con respecto a valores del lote alimentado. ....	88
Tabla 12. Distribución de N-glicanos de cultivos por lote alimentado y perfusión intermitente.....	91

## Índice de figuras

Figura 1 (A) Esquema de cultivo por lote alimentado (B) Cultivo por perfusión con flujos de medio, cosecha y remoción celular .....	20
Figura 2 Concentración celular de lote alimentado de bajo inóculo (LS FB), lote alimentado de alto inóculo (HS FB) y perfusión (PF) .....	24
Figura 3 Comparación de título entre lotes alimentados (HS FB y LS FB) y perfusión (PF).....	25
Figura 4 Separador acústico. ....	28
Figura 5 Representación esquemática del principio de la filtración de flujo tangencial.....	29
Figura 6 Representación esquemática de filtración de flujo tangencial alternado. Adaptada de (Chotteau, 2015). ....	30
Figura 7 Anticuerpo monoclonal con sitio conservado de glicosilación.. ....	32
Figura 8 Tipos de N-glicanos.....	33
Figura 9 Proceso de glicosilación en células CHO.....	35
Figura 10 Glicosilación constante en el tiempo en cultivos por perfusión. ....	36
Figura 11 Modificaciones que generan variantes de carga de un AcM. Adaptado de B. Beyer et al. 2018.....	38
Figura 12 Comparación de perfil de isoformas para lote alimentado y para perfusión en cosecha de día 10, 14, 18, 20 y 23.....	39
Figura 13 Tren de trabajo para cultivos en modo perfusión intermitente.....	44
Figura 14. Diagrama de tapa de biorreactor para cultivo de células CHO por perfusión con separador acústico.....	45
Figura 15 Organización de componentes para cultivo en perfusión.....	45
Figura 16 Organización de biorreactor para operación en modo perfusión.....	46
Figura 17 Dispositivo de retención celular Mini BioSep 1 L/día.....	47
Figura 18 Concentración celular viable lote alimentado (control) y perfusión intermitente a 0.5 ,0.75 y 1 d <sup>-1</sup> en Medio A y B.....	56
Figura 19 Viabilidad de lote alimentado (control) y perfusión intermitente a 0.5, 0.75 y 1 d <sup>-1</sup> en Medio A y B. ....	57

Figura 20 Velocidad específica de crecimiento normalizada para lote alimentado y perfusión intermitente.....	59
Figura 21 Los cultivos de perfusión pueden llegar a durar hasta 5.6 veces el tiempo de los lotes alimentados. ....	60
Figura 22 Viabilidad de lote alimentado y de cultivos en perfusión. ....	60
Figura 23 Concentración celular normalizada de biorreactor 1 y 2 en comparación con matraz a la misma tasa de perfusión (0.75 d-1). ....	62
Figura 24 Viabilidad de cultivos en biorreactor en comparación con cultivo en matraz a tasa de 0.75 d-1.....	62
Figura 25 Tasa de perfusión específica y concentración celular para cultivos con medios A, B y C.....	64
Figura 26 Concentración de anticuerpo monoclonal en lote alimentado y perfusión a distintas tasas.....	67
Figura 27 Cantidad total de anticuerpo monoclonal acumulado en el tiempo. ....	67
Figura 28 AcM producido en cultivos por perfusión realizados en biorreactor a una tasa de perfusión de 0.75 d <sup>-1</sup> en comparación con el realizado en matraz.....	71
Figura 29 Gráficas de concentración normalizada de glucosa y lactato para tasa de perfusión de 1, 0.75 y 0.5 d <sup>-1</sup> con datos antes y después del proceso de perfusión intermitente.....	74
Figura 30 Gráficas de concentración normalizada de glutamina y glutamato para tasas de perfusión de 1, 0.75 y 0.5 d <sup>-1</sup> , con datos antes y después del proceso de perfusión intermitente.....	75
Figura 31. Gráficas de concentración normalizada de Glc, Lac, Gln y Glu para tasa de perfusión de 1 d <sup>-1</sup> , con el medio C con datos antes y después del proceso de perfusión intermitente.....	76
Figura 32 Gráficas de concentración normalizada de glucosa y lactato, antes del recambio diario de medio de cultivo para tasa de perfusión de 1, 0.75 y 0.5 d <sup>-1</sup> ...	77
Figura 33 Gráficas de concentración normalizada de glutamina y glutamato, antes del recambio diario de medio de cultivo, para tasa de perfusión de 1. 0.75 y 0.5 d <sup>-1</sup> . ....	78

Figura 34. Gráficas de concentración normalizada de Glc, Lac, Gln y Glu para tasa de perfusión de 1 d-1, con el Medio C con datos antes del proceso de perfusión intermitente.....	79
Figura 35 A) Rendimiento de células con respecto a glucosa consumida, (B) anticuerpo monoclonal con respecto a células viables, (C) anticuerpo monoclonal con respecto a glucosa consumida y (D) lactato con respecto a glucosa consumida.....	81
Figura 36. Relación entre rendimiento de células con respecto a glucosa y AcM con respecto a células.....	81
Figura 37 Velocidades específicas de consumo y de producción de glucosa (glc), lactato (lac), glutamina (gln) y glutamato (glu).....	82
Figura 38 Velocidad específica de producción de AcM normalizado con respecto a lote alimentado.....	83
Figura 39 Colectas de cosechas (partidas) realizadas para pruebas de calidad del anticuerpo monoclonal. ....	85
Figura 40 Cromatografía de intercambio catiónico para la determinación de variantes de carga del anticuerpo monoclonal producido por lote alimentado (azul) y perfusión (rojo). ....	86
Figura 41 Distribución de variantes de carga normalizadas con respecto a lote alimentado.....	87
Figura 42 Perfil de variante de cargas con respecto al tiempo. El cuadro azul denota los límites de la especificación. ....	89
Figura 43 Cromatograma representativo de análisis de patrón de N-Glicosilación. ....	90
Figura 44 Perfil de N-glicosilación de lote alimentado y perfusión intermitente.....	91
Figura 45 Patrones de N-glicosilación en el tiempo clasificados por principales grupos de glicanos.. ....	93
Figura 46. Patrones de N-glicosilación en el tiempo clasificados por principales grupos de glicanos. ....	93

## Símbolos y Abreviaturas

$\mu$ : Velocidad específica de crecimiento

2-AB: 2-aminobenzamida

AcM: Anticuerpo Monoclonal

ACN: Acetonitrilo

ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpo

Asn: Asparagina

ATF: Filtración de flujo tangencial alterno (*Alternating Tangential Flow*)

BHK: Células de riñón de hamster bebé (*Baby Hamster Kidney*)

CDC: Citotoxicidad dependiente de complemento

CEX: Cromatografía de intercambio catiónico

CHO: Ovario de hámster chino

CHO K1: subclona de la línea celular CHO original adaptada para crecimiento en suspensión en medio químicamente definido libre de suero usada para la expresión de proteínas recombinantes.

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CSPR: Tasa de perfusión específica (*Cell Specific Perfusion Rate*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

Fab: Fragmento de unión al antígeno

Fc: Fracción cristalizable

G0: Glicano sin galactosas

G1: Glicano con 1 galactosa terminal

G2: Glicano con 2 galactosas terminales

Gal: Galactosa

GLcNAc: N-Acetilglucosamina

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

HEK293: Células embrionarias de riñón humano (*Human Embryonic Kidney*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HS: Alto inóculo (*High Seed*)

ICV: Índice de células viables  
IgG: Inmunoglobulina G  
LS: Bajo inóculo (*Low Seed*)  
Man: Manosa  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato Dibásico de Sodio  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Fosfato Monobásico de Sodio  
NaCl; Cloruro de sodio  
NS0: Células de mieloma murino  
PBS: Solución amortiguadora de fosfatos (*Phosphate Buffer Saline*)  
PDA: Arreglo de fotodiodos (*Photodiode array*)  
PER.C6: Células de retina humana embrionaria  
q<sub>glc</sub>: Velocidad específica de consumo de glucosa  
q<sub>gln</sub>: Velocidad específica de consumo de glutamina  
q<sub>lac</sub>: Velocidad específica de producción de lactato  
q<sub>glu</sub>: Velocidad específica de producción de glutamato  
q<sub>AcM</sub>: Velocidad específica de producción de anticuerpo monoclonal  
rcf: Fuerza centrífuga relativa  
RE: Retículo endoplásmico  
rpm: Revoluciones por minuto  
SDS: Dodecilsulfato sódico  
Ser: Serina  
Sp2/0: Células murinas linfoides  
Thr: Treonina  
UPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (*Ultra-Performance Liquid Chromatography*)  
Y<sub>m1/m2</sub>: Rendimiento de metabolito 1 con respecto a metabolito 2

## 1. Resumen

En la última década se ha registrado un constante aumento de la demanda en el mercado internacional de biofarmacéuticos, como resultado, se ha vuelto inminente la necesidad de desarrollar nuevos procesos de producción que permitan una mayor producción de producto de interés y reducir costos de fabricación. Los cultivos en perfusión, comparados con cultivos por lote o lote alimentado permiten por lo general mayor producción diaria del producto de interés.

En este trabajo se implementó un sistema de perfusión intermitente en matraces a pequeña escala con el objetivo de evaluarlo como sistema experimental modelo de un proceso de perfusión real. En el sistema se ensayaron tres medios de cultivo diferentes y cuatro tasas de perfusión entre  $0.5 \text{ d}^{-1}$  y  $2.0 \text{ d}^{-1}$ . Los resultados se compararon con cultivos controles por lote alimentado a la misma escala.

Los resultados demostraron que con el sistema a pequeña escala de perfusión intermitente propuesto se puede llegar a obtener hasta el doble de concentración celular que en un lote alimentado y un rendimiento de 1.6 veces más cantidad de anticuerpo por día de cultivo que en lote alimentado. Además, se logró extender la duración de los cultivos por perfusión hasta 5.6 veces más que los cultivos por lote alimentado, aunque con un gasto mayor de medio de cultivo (6.05 veces más volumen por la misma cantidad de AcM producido). Dependiendo del medio de cultivo utilizado se lograron tasas de perfusión específicas (CSPR) desde 17.8 hasta  $74.7 \text{ pL/cel} \cdot \text{día}$ . En general se observó un aumento en el consumo de metabolitos conforme la tasa de perfusión aumenta y una mayor velocidad de producción de AcM en los cultivos por perfusión comparado con lote alimentado. La calidad del producto en los cultivos por perfusión mejoró con respecto a cultivos por lote alimentado, ya que se logró obtener 48% menos variantes ácidas y 49% menos variantes básicas, además de aumentar el valor correspondiente al producto principal en 30%. En cuanto al patrón de N-glicosilación del AcM producido, solo se encontró un incremento del doble en los niveles de galactosilación, condición que puede resultar ventajosa para glicoproteínas de interés farmacéutico. Finalmente, se realizaron pruebas preliminares de cultivos de perfusión en biorreactores instrumentados y empleando un dispositivo de separación celular acústico, encontrándose una correspondencia adecuada con el modelo de perfusión intermitente en matraces.



En conclusión, los resultados del presente trabajo evidencian que experimentos en escala laboratorio (matraz) pueden proporcionar resultados equiparables a los cultivos continuos en biorreactores y por ende guiar la optimización de procesos a grande escala para el producto aquí estudiado. Asimismo, este trabajo mostró el potencial que tienen los cultivos en perfusión como alternativa para intensificar el proceso de producción de AcM en comparación con proceso por lote alimentado.

**La presente tesis ha sido desarrollada con el apoyo de Laboratorios Liomont S.A de C. V. Dicha colaboración ha permitido obtener valiosos recursos, acceso a datos y conocimiento especializado en un marco de confidencialidad acordado entre las partes, por lo que, respetando los acuerdos de confidencialidad establecidos y garantizando la protección de información sensible todos los datos mostrados en la presente tesis se encuentran normalizados. La base de normalización se explica en las secciones correspondientes.**

## 2. Introducción

La biotecnología ha adquirido un rol fundamental en la industria farmacéutica, específicamente en la producción de biofármacos que ofrecen tratamientos únicos y poderosos para diversos padecimientos. Entre los medicamentos biotecnológicos más utilizados se encuentran los anticuerpos monoclonales (AcM), los cuales se utilizan para el tratamiento de cáncer, rechazos de trasplantes, tratamientos de cardiopatía coronaria, prevención de enfermedades autoinmunes, prevención de enfermedades infecciosas, diagnóstico clínico e investigación (Karst et al., 2018). La implementación de la tecnología de producción de biofármacos requiere, entre otros aspectos, de la optimización de distintas variables incluyendo, por ejemplo: la mejor línea y clona celular capaz de sintetizar las moléculas requeridas a la calidad adecuada y una productividad que asegure el bajo costo de operación. Además de condiciones de cultivo en biorreactor y medio de cultivo que alcancen el rendimiento deseado, las especificaciones de producto requeridas y el entendimiento del desempeño del cultivo en diferentes escalas para asegurar un escalamiento exitoso (Li et al., 2010).

La transición de cultivos en lote a continuos para la producción de biofármacos es un paso común en el desarrollo industrial (Karst et al., 2018). En el desarrollo de todos los procesos de producción las decisiones con respecto a los mejores parámetros y métodos de proceso se toman con base en comparaciones de costo, tiempo, rendimientos, escalamiento y calidad. La operación continua requiere de una buena comprensión de los fundamentos del proceso y la capacidad de controlar adecuadamente su operación. La tecnología de manufactura tiende a desarrollarse primero en procesos tipo lote y lote alimentado hasta alcanzar la madurez para evolucionar en una operación continua. Los cultivos continuos conllevan ciertos retos que deben ser considerados y evaluados para poder transformar de una manera efectiva, un proceso en lote a un proceso continuo o semicontinuo.

Los cultivos continuos para la manufactura de biofármacos han tenido un crecimiento significativo en los últimos años, y han resultado en la intensificación de procesos para mejorar significativamente la producción de AcM en comparación con el cultivo convencional de lote alimentado (Xu et al., 2017). Los cultivos por perfusión consisten, entre otras cosas, en mantener las células dentro del biorreactor mediante el empleo de un dispositivo de retención celular, mientras se intercambia medio continuamente, adicionando medio fresco con nutrientes y removiendo subproductos. Adicionalmente, cuando el producto es secretado, se remueve continuamente en la corriente de medio cosechado. Los cultivos continuos alcanzan estados estacionarios con condiciones de proceso definidas, velocidad de crecimiento, concentraciones de nutrientes y comportamiento metabólico constante. La combinación de una concentración celular constante y el corto tiempo de residencia en el biorreactor del producto de interés resulta en una baja variabilidad de los atributos críticos de calidad como por ejemplo el patrón de N-glicosilación.

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Los cultivos continuos como opción de intensificación de bioprocesos

Desde 1986, cuando se comercializó el primer biofármaco producido en células recombinantes de mamíferos se ha debatido sobre la necesidad de transitar de una fabricación clásica por lotes a una continua (Bielser et al., 2018). El desarrollo del proceso de fabricación “debe identificar cualquier parámetro crítico del proceso y ser monitoreado o controlado para asegurar que el producto sea de la calidad deseada y así ofrecer resultados coherentes y reproducibles” (ICH Q8, 2009). En general, las propiedades celulares, y el proceso de producción pueden afectar la calidad y seguridad del producto resultante. Por lo tanto, para mantener la calidad, eficacia y seguridad de estos productos se requieren controles adecuados en todos aspectos del manejo de la células (Chotteau, 2015).

Aunque el cultivo por lote alimentado está bien establecido y hoy en día todavía se favorece en la producción industrial, los cultivos de perfusión son una herramienta valiosa para proteínas inestables y una opción para intensificar los bioprocesos. En un lote alimentado se añaden los nutrientes necesarios durante el inicio del cultivo y el producto se acumula en el biorreactor hasta ser cosechado al terminar la operación. En contraste, en la operación por perfusión se alimenta continuamente el medio fresco y continuamente se cosecha medio metabolizado y producto de interés, mientras se retienen las células dentro del biorreactor a través de diferentes dispositivos (Figura 1) (Bielser et al., 2018). Las células se cultivan hasta que se alcanza una concentración celular deseada y se mantiene de manera estable en el llamado “estado estacionario”. Generalmente esta concentración celular estable se controla con la remoción parcial de células o *bleeding* para eliminar el exceso de células y mantener una concentración celular constante y un crecimiento bajo. Mediante la perfusión, se logra mantener una concentración celular constante en un estado estacionario ideal, abasteciendo continuamente nutrientes, removiendo subproductos tóxicos y células muertas y demás desechos celulares.

Es importante mencionar que el proceso de perfusión típicamente consiste en tres diferentes fases: una fase inicial tipo lote donde hay acumulación celular y se generan altas densidades celulares para pasar a la siguiente fase de producción donde se inicia la perfusión a tasas que pueden ser variables y en la que la concentración celular sigue en aumento, y una tercer fase llamada estado estacionario, en donde se mantiene la densidad celular a un nivel estable y el cual se puede mantener durante tiempos prolongados empleando tasas de perfusión constantes. Típicamente durante la fase inicial de perfusión se escogen altas tasas de perfusión para favorecer el crecimiento celular, mientras que durante la fase estacionaria la tasa de perfusión disminuye y se mantiene en un nivel óptimo para producir el producto de interés a la mayor concentración posible, con un crecimiento celular y consumo de medio mínimos (Wolf et al., 2020).

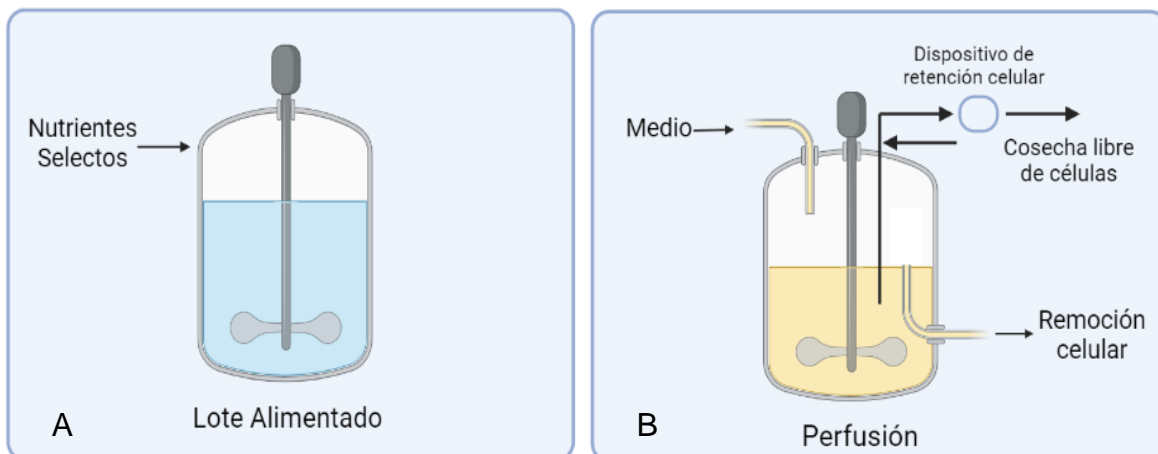


Figura 1 (A) Esquema de cultivo por lote alimentado (B) Cultivo por perfusión con flujos de medio, cosecha y remoción celular

Los parámetros básicos que definen a un proceso por perfusión son: la tasa de intercambio de medio o tasa de perfusión que puede ser definida por la Ecuación 1, expresada en volumen de medio por volumen de biorreactor por día. Alternativamente, también es útil emplear el concepto de tasa de perfusión específica o *cell specific perfusión rate* (CSPR por sus siglas en inglés) (Ecuación 2) que comúnmente se expresa en picolitros por célula por día. La tasa de perfusión

representa variables operacionales y no da información de la concentración celular, mientras que la CSPR indica el consumo de medio por célula y da información acerca del desempeño del medio. Una CSPR baja significa que más células pueden ser mantenidas con cierta cantidad de medio en un periodo de tiempo determinado.

$$\text{Tasa de perfusión} = P = \frac{F_{in}}{V} \left[ \frac{L_{medio}}{L_{reactor} \cdot \text{día}} \right] \dots\dots\dots (1)$$

$$CSPR = \frac{P}{X_V} \left[ \frac{p_L \text{ medio}}{\text{células.día}} \right] \dots\dots\dots (2)$$

donde:

$$X_V = \text{Concentración de células vivas} \left[ \frac{10^6 \text{ cel}}{\text{mL}} \right]$$

$$F_{in} = \text{Flujo total de medio alimentado} = F_{cosecha} + F_{remoción \text{ celular}}$$

$$V = \text{Volumen de reactor}$$

Además de la CSPR, se calcularon los siguientes parámetros para comparar entre las dos modalidades de cultivo:

*Rendimiento Global:*

$$Y_{total \text{ lote alimentado}} = \frac{c_{AcM} V}{t_{cosecha}} \left( \frac{g_{AcM}}{\text{días}} \right) \dots\dots\dots (3)$$

$$Y_{total \text{ perfusión}} = \frac{\bar{c}_{AcM} V}{t_{total}} \left( \frac{g_{AcM}}{\text{días}} \right) \dots\dots\dots (4)$$

donde:

$$c_{AcM} = \text{Concentración de AcM en mg/mL}$$

*Rendimiento de medio requerido por cantidad de AcM producido para lote alimentado y perfusión:*

$$Y_{\frac{medio}{AcM}} = \frac{V_{total}}{AcM_{total}} \left( \frac{mL \text{ medio}}{g_{AcM}} \right) \dots\dots\dots (5)$$

*Productividad volumétrica:*

$$P_{V \text{ lote alimentado}} = \frac{c_{AcM}}{t_{cosecha}} \left( \frac{mg}{mL \text{ día}} \right) \dots\dots\dots (6)$$

$$P_{V \text{ perfusión}} = \frac{\sum_i^n AcM_i * P}{i} \left( \frac{mg}{mL \text{ día}} \right) \dots\dots\dots (7)$$

donde:

n = número de mediciones

i = medición "i"

$$P_{V \text{ perfusión diaria}} = c_{AcM} * P \left( \frac{mg}{mL \text{ día}} \right) \dots\dots\dots (8)$$

*Velocidad específica de crecimiento*

$$\mu = \frac{\ln(x_i) - \ln(x_{i-1})}{\Delta t} \dots\dots\dots (9)$$

Otro parámetro relevante es la remoción celular o "*cell bleeding*", que corresponde a las células que se remueven del biorreactor, con el fin de mantener una concentración celular constante en un valor establecido. La productividad y el rendimiento dependen de la tasa de perfusión. Por ejemplo, una tasa de perfusión alta generalmente permite la generación de más biomasa y, por lo tanto, más producto. Sin embargo, si se desea mantener un alto crecimiento, entonces será necesario mantener una alta tasa de remoción celular y así, obtener un estado estacionario. En el caso de que no se remuevan las células, se llegará a un valor máximo de concentración celular que estará limitado por algún nutriente, subproducto tóxico y/o por transferencia de masa. En este sentido, se necesita

definir un intervalo de operación estable, donde la concentración celular sea lo suficientemente alta para alcanzar una productividad deseada, pero en un estado donde el crecimiento celular sea controlado ya sea por limitación de nutrientes u otros factores ambientales para minimizar la remoción celular. Todos estos parámetros dependen del desempeño de la línea celular que tiene sus propias características de consumo de nutrientes y producción de productos (Bielser et al. 2018).

Las principales diferencias benéficas de los cultivos en perfusión en comparación con el cultivo por lote y el lote alimentado, son: un menor tiempo de residencia del producto en el biorreactor y por ende menor posibilidad de degradación o afectación a sus parámetros críticos de calidad, mayor concentración celular y productividad volumétrica diaria. Otras ventajas del cultivo en perfusión son periodos de cultivo más largos, cultivos con mayores viabilidades y un mejor control del entorno celular, ya que se mantiene un estado estacionario en la mayoría de las variables. Gracias a que en general se logra una mayor productividad volumétrica y una operación que minimiza tiempos muertos, al realizar cultivos en perfusión se pueden utilizar biorreactores más pequeños que los utilizados para los procesos de lotes alimentados, en al menos un orden de magnitud menor, para fabricar cantidades equivalentes del producto de interés (Chotteau, 2015).

Los procesos de perfusión también tienen retos relevantes: son procesos desafiantes desde el punto de vista técnico, ya que se complica el mantenimiento de la esterilidad debido a la entrada y salida continua de medio de cultivo y requieren grandes volúmenes de alimentación y cosecha de medio de cultivo que se acumulan continuamente. Adicionalmente, las mayores concentraciones celulares conducen a limitaciones potenciales en la transferencia de masa, por lo que el control del oxígeno y el dióxido de carbono disueltos en niveles adecuados, sin causar daño hidrodinámico, se convierten en parámetros críticos (Chotteau, 2015). Uno de los mayores retos es elegir y contar con un dispositivo de retención celular confiable que permita una operación prolongada, sencilla y sin obstrucciones por células y/o



desechos celulares, además de que no dañe las células mecánicamente o las someta a condiciones adversas como por ejemplo gradientes adversos en variables fisicoquímicas. (Chotteau, 2015)

Diversos autores concuerdan en que los cultivos continuos, particularmente los de perfusión, otorgan en general beneficios de productividad y calidad inherentes a la naturaleza del procesamiento continuo. (Becker et al., 2019; Chotteau, 2015; Maria et al., 2023; Qin et al., 2022). Bielser et al. (2019) realizaron un estudio con 3 tipos distintos de cultivos para la producción de un anticuerpo monoclonal que tiene una proteína de unión en su extremo C-terminal. Utilizaron una línea celular CHO-K1 que cultivaron en tres formas: lote alimentado con un inóculo alto (*High Seed*, HS) y bajo (*Low Seed*, LS) y cultivo de perfusión con un dispositivo de retención celular de filtración de flujo tangencial a una tasa de perfusión de  $1 \text{ d}^{-1}$ . Como se puede observar en la Figura 2, obtuvieron que en un cultivo por perfusión se alcanza alrededor de  $38 \times 10^6$  células/mL, mientras que, en los cultivos por lote alimentado, se alcanzaron  $25 \times 10^6$  células/mL en el HS y  $12 \times 10^6$  células/mL en el LS. También observaron que la viabilidad se mantuvo constante y por encima de 90% durante todo el cultivo por perfusión, mientras que decayó a menos de 90% a la mitad de los cultivos de lote alimentado. Este resultado está asociado a los cultivos continuos debido al mantenimiento de un estado estacionario y continuo abasto de nutrientes necesarios para el mantenimiento de las células.

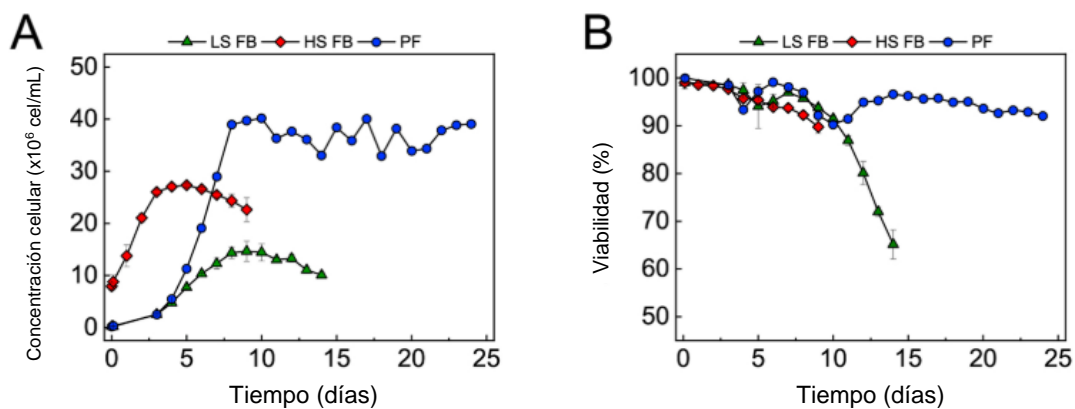


Figura 2 Concentración celular de lote alimentado de bajo inóculo (LS FB), lote alimentado de alto inóculo (HS FB) y perfusión (PF); Adaptado de Bielser, et al. 2019. La concentración celular en cultivos por perfusión es más alta y se mantiene viable por 10 días más con respecto al lote alimentado.

En la figura 3 se muestra el título obtenido en cada uno de los cultivos de lote alimentado (LS FB y HS FB) y el cultivo en modo perfusión (PF). El cultivo LS tuvo una duración de 14 días y alcanzó un título final de 1.35 g/L mientras que el HS tuvo una duración de 9 días y alcanzó un título de 3.07 g/L. La duración del cultivo en perfusión fue de 24 días y la fase de producción fue entre el día 10 y 24, durante este periodo el título varió entre 0.57 a 0.82 g/L.

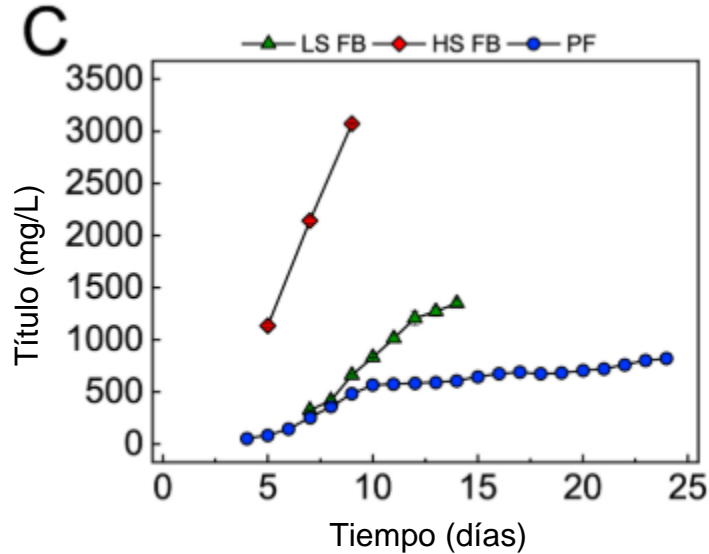


Figura 3 Comparación de título entre lotes alimentados (HS FB y LS FB) y perfusión (PF). Adaptado de (Bielser et al., 2019). En los cultivos por perfusión se observa que se obtiene una fracción de la concentración alcanzada en lote alimentado, sin embargo, la cantidad de anticuerpo monoclonal se acumula con las cosechas diarias que se realizan.

Tomando en cuenta la duración de cada lote alimentado respectivamente, concluyen que el cultivo de lote alimentado de bajo inóculo (LS) tuvo una productividad volumétrica de 0.096 g/L\*d y el cultivo de alto inóculo (HS) 0.34 g/L\*d mientras que para el cultivo por perfusión se obtuvo una productividad volumétrica de 0.67 g/L\*d, es decir 7 veces más que el cultivo en lote alimentado (LS) y 2 veces más que el cultivo de HS. Estos valores aplican a este caso en específico, sin embargo, resaltan el gran potencial de la tecnología de perfusión en donde se puede duplicar la productividad volumétrica obtenida en procesos por lote alimentado (Bielser et. al, 2019).

### 3.2 Dispositivos de retención celular para cultivos por perfusión en biorreactor

Para un procesamiento de perfusión eficiente, es necesario seleccionar un dispositivo de separación celular confiable y fácil de operar mediante el cual se puedan retener las células dentro del biorreactor y al mismo tiempo cosechar continuamente medio metabolizado. La incorporación de un dispositivo de retención de células permite alcanzar concentraciones más altas de células viables, que procesos en lote, lote alimentado o continuo, lo que aumenta significativamente el consumo de nutrientes en comparación con los modos clásicos de cultivo (Chotteau, 2015). Las mayores demandas metabólicas se acompañan de requisitos elevados en términos de transferencia de oxígeno, eliminación de CO<sub>2</sub> y homogeneización del caldo de cultivo.

Algunos de los dispositivos de separación celular que han sido reportados en la literatura con base en diferentes principios físicos son:

- **Filtración por filtro de flujo tangencial o de flujo cruzado.** Por ejemplo, filtro de fibra hueca (HF), filtro de flujo de vórtice, filtro rotatorio (“spin filter”) o filtro de perfusión flotante.
- **Sedimentadores.** Por ejemplo: sedimentador inclinado, sedimentador acústico, centrífuga continua e hidrociclones.

La robustez del dispositivo es fundamental para un funcionamiento eficiente y así lograr altas densidades celulares (Bielser et al. 2018). Los parámetros que pueden afectar a la eficiencia de separación son el ciclo de trabajo (prendido/apagado del dispositivo de separación), tasa de recirculación y tasa de perfusión. Algunos de los dispositivos de retención celular más populares hasta el momento son los siguientes:

### 3.2.1 Separador acústico

La filtración acústica de células animales se basa en la captura mecánica/acústica de las células seguida de una sedimentación mejorada como principio de separación. El sistema de filtración acústica no contiene ninguna barrera física, por lo que nunca se presentará el problema de taponamiento de membranas de filtración ni estrés mecánico hacia las células. Las células quedan atrapadas en un campo acústico de aproximadamente 2 MHz mientras el medio fluye a través del campo, como se muestra en la figura 4a (Chotteau, 2015). La acumulación de células en los planos de antinodos de velocidad se debe a varias fuerzas acústicas y conduce a una mayor sedimentación como se muestra en la figura 4b. Con estos sistemas se han obtenido concentraciones de células CHO de hasta  $25 \times 10^6$  células/mL con eficiencias de separación del 90% para velocidades de perfusión de hasta 10 L/día para reactores con volumen de trabajo de 600-700 mL (Gränicher et al., 2020). Los separadores acústicos han demostrado ser escalables a tasas de perfusión de al menos 200 L/día (Gorenflo et al., 2005).

La implementación exitosa de un dispositivo de separación acústico a escala industrial depende en gran medida de su capacidad para lograr una alta eficiencia de separación a velocidades de flujo más altas por lo que se requerirían filtros acústicos de mayor tamaño. Existen otras variables de consideración como es la energía necesaria para crear las ondas y el efecto de calentamiento asociado, lo cual puede ser perjudicial para las células. Esto se ha solucionado a través de sistemas de enfriamiento mediante circulación de agua a escalas de 200L (Chotteau, 2015).

El separador acústico es un buen dispositivo de retención celular debido a su robustez, ausencia de piezas desechables, facilidad de manejo y operación, facilidad de limpieza y esterilización, y no requiere una barrera física. Para optimizarlo se requiere tomar en cuenta parámetros como la potencia, frecuencia de contralavado, velocidad de flujo de cosecha y recirculación para poder lograr altas eficiencias de separación (90-100%) (Shirgaonkar et al., 2004).

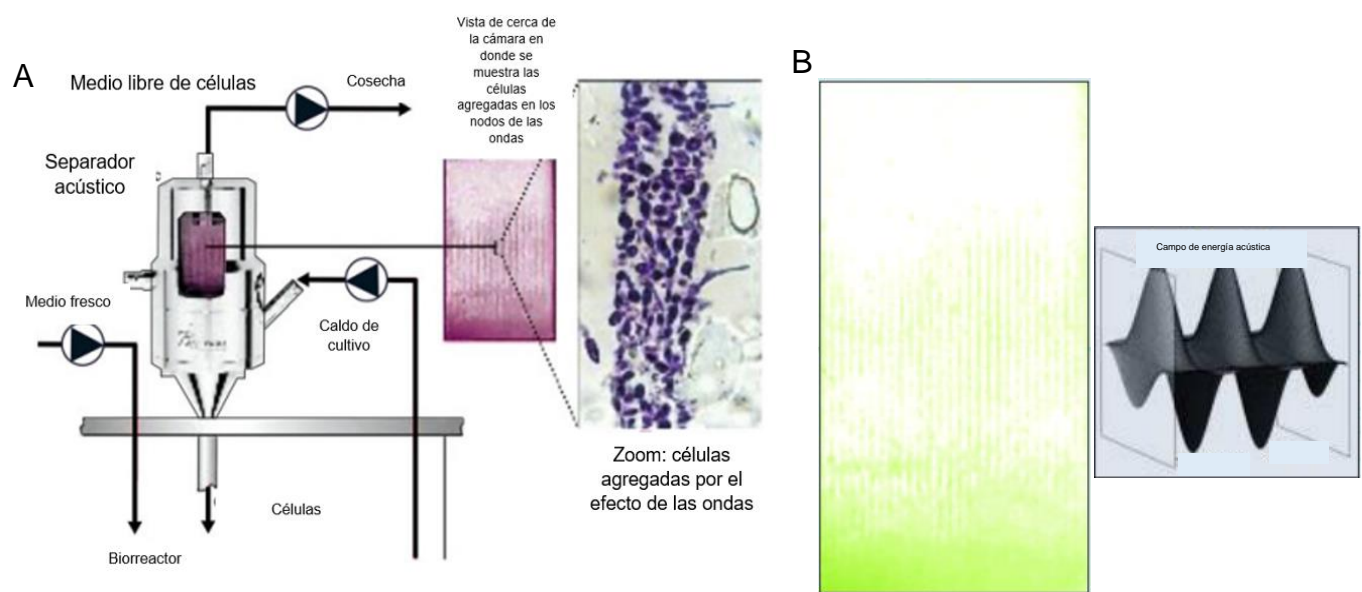


Figura 4 Separador acústico. (A) Funcionamiento del separador acústico (B) Vista de cerca de la cámara de separación. Las células se agregan en líneas verticales en los antinodos de las onda. Adaptada de (Chotteau, 2015)

Ryll et al., (2000) realizaron cultivos de células CHO productoras de una proteína recombinante en perfusión con la tecnología de separador acústico (Applikon) en biorreactores instrumentados de 3L con 1.5L de volumen de trabajo. En el trabajo de Ryll y colaboradores, con el dispositivo de separación acústico, se obtuvo una eficiencia de separación de 99% hasta una tasa de perfusión de  $12 \text{ d}^{-1}$ , este desempeño se mantuvo y no obtuvo cambios notables durante 51 días. Estos autores mencionan que existen dos razones principales para elegir el modo de operación en perfusión en lugar de los sistemas tradicionales de lote o lote alimentado y son: el aumento en la productividad volumétrica que se puede lograr con un volumen de reactor dado y la reducción del tiempo de residencia del producto en los que existan casos de inestabilidad o degradación proteolítica o algún otro factor que afecte la calidad de este. (Ryll et al., 2000)

### 3.2.2 Filtración de flujo tangencial (TFF)

El principio de la filtración de flujo cruzado ó *Tangencial Flow Filtration* es forzar a la suspensión celular a fluir tangencialmente a la membrana del filtro. Este tipo de filtración se desarrolló para reducir el taponamiento de las membranas debido a la deposición de partículas en los poros y los gradientes de concentración de macromoléculas, que causan agregación y formación de gel (Voisard et al. 2003). En TFF, la alimentación del biorreactor fluye paralelamente a la superficie de la membrana (figura 5). Esta tasa de flujo cruzado retiene las células en la ruta del fluido y permite que regresen al biorreactor. Una vez que ha comenzado la perfusión, una parte del líquido que pasa a través del canal de alimentación se mueve a través de la membrana y sale del dispositivo, a través del perfundido, que está controlado por una bomba peristáltica.

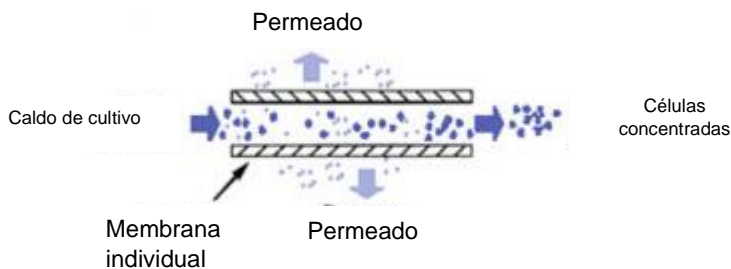


Figura 5 Representación esquemática del principio de la filtración de flujo tangencial. Adaptada de (Chotteau, 2015). El caldo de cultivo pasa a través de la membrana de filtración y se obtiene el permeado libre de células mientras que por el otro lado se regresan las células concentradas al biorreactor.

### 3.2.3 Filtración de flujo tangencial alternado (ATF)

La filtración de flujo tangencial alterno (ATF) ó *Alternating Tangential Flow* basada en membranas es, hasta la fecha, la tecnología de retención celular más utilizada para la producción de proteínas recombinantes, como los AcM (Gränicher et al. 2020). El sistema ATF se ha aplicado para la siembra de alta densidad celular, la criopreservación y la producción continua integrada de bioterapéuticos. Una bomba de diafragma recicla periódicamente el caldo de cultivo celular a través de un módulo de fibra hueca, creando así un flujo recíprocante. La aplicación de una

bomba de diafragma para impulsar el circuito externo en lugar de las bombas peristálticas de uso común reduce la exposición de las células a altos valores de estrés hidrodinámico. Más importante aún, la presión periódica y el ciclo de escape en el ATF crea un “retrolavado” a través de los poros del filtro desde el lado del permeado, cambiando significativamente la hidrodinámica del sistema. Se cree que el cambio inducido en la dirección del flujo y el gradiente de presión resultante en la superficie interna de la fibra mitigan el taponamiento de la membrana.

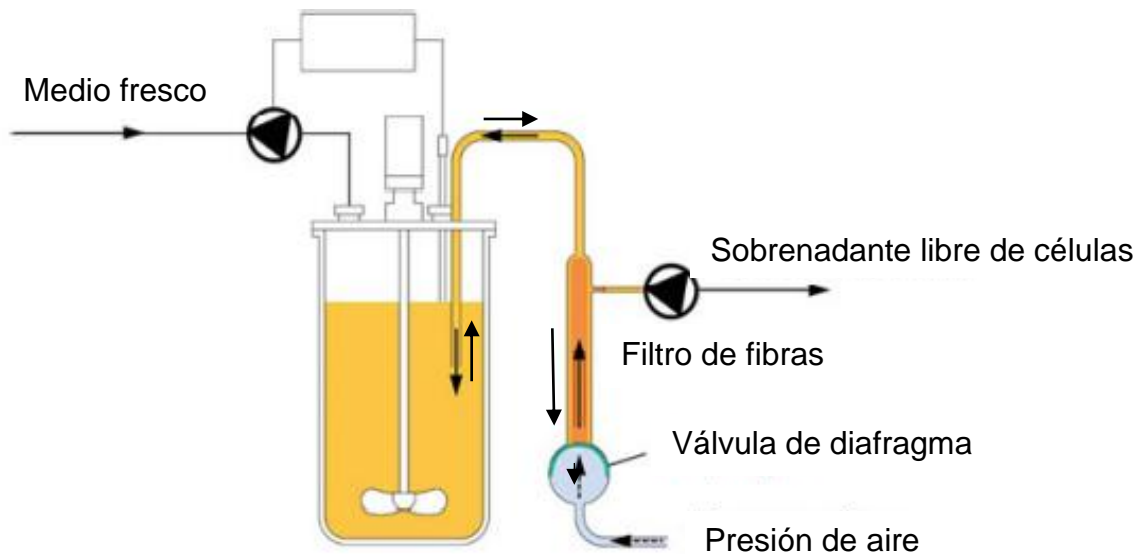


Figura 6 Representación esquemática de filtración de flujo tangencial alternado. Adaptada de (Chotteau, 2015). El cultivo entra al filtro con fibras hueca y a través de la bomba de diafragma genera un retro flujo del que se obtiene el sobrenadante libre de células y las células de regreso al biorreactor.

### 3.3 Sistema de expresión de anticuerpos monoclonales

Las células de mamíferos son preferidas sobre otros sistemas de expresión, como los basados en bacterias y levaduras, ya que pueden realizar modificaciones postraduccionales, como por ejemplo la N-glicosilación, similares a las proteínas nativas encontradas en el cuerpo humano. Las modificaciones postraduccionales con frecuencia determinan la actividad biológica de proteínas complejas como los AcM. Los AcM terapéuticos se expresan principalmente en células de ovario de hámster chino (CHO), de riñón de hámster bebé (BHK), células murinas linfoides

(Sp2/0), células de mieloma murino NS0, células de riñón humano embrionario (HEK293) y células de retina humana embrionaria (PER.C6) (Dhara et al., 2018). De todas estas líneas celulares, las células CHO son las más utilizadas en la industria. Las células CHO se emplean para fabricar aproximadamente el 70% de todas las proteínas terapéuticas recombinantes, y su uso generalizado se debe a su facilidad de manipulación genética, escalabilidad, capacidad de adaptación a medios libres de suero y su aprobación por los organismos regulatorios (Dhara et al. 2018).

### **3.4 Calidad del anticuerpo monoclonal en cultivo continuo**

Los AcM son glicoproteínas de aproximadamente 150 kDa, con un alto nivel de heterogeneidad debida a sus varias modificaciones post traduccionales y eventos que los pueden dañar y degradar la molécula durante todas las etapas de proceso de su manufactura. En el caso de los AcM, es bien sabido que los atributos de calidad del producto, como la N-glicosilación, las variantes de carga o la degradación en fragmentos, tienen un gran impacto en la farmacocinética, la respuesta inmune y, en general, la bioactividad de los AcM, de ahí que su control sea de gran importancia. En cultivos tradicionales de lotes alimentados, las células de mamíferos sufren un entorno cambiante, y en particular exponen por tiempos prolongados al producto de interés a componentes celulares liberados durante la lisis celular, lo que suele dar lugar a cambios en la calidad del producto a lo largo del cultivo. Por el contrario, los cultivos continuos proporcionan un entorno constante, al mantener a las células en un estado metabólico estable que puede generar altas viabilidades celulares. Además, debido al recambio continuo de medio de cultivo, se manejan bajos tiempos de residencia del producto de interés en el biorreactor, lo que puede llegar a evitar variaciones en los atributos de calidad de las proteínas producidas. (Ryll et al., 2000)



### 3.4.1 N-glicosilación

En particular, la glicosilación es un proceso complejo de unión de oligosacáridos al esqueleto polipeptídico de una proteína, y tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. Hay diferentes tipos de glicosilación entre la que se encuentra la glicosilación ligada a la asparagina o N-glicosilación y la ligada a serina o treonina u O- glicosilación. (Cumming, 1991). En los anticuerpos monoclonales la N-glicosilación es la más común, en donde los glicanos se unen a una asparagina, generalmente en la posición 297, en una secuencia conservada (asparagina seguida de cualquier aminoácido, excepto prolina, y seguida de ya sea serina o treonina) en el dominio CH2 de la región Fc del anticuerpo, como se muestra en la Figura 7 (Sha et al. 2016). La estructura del glicano consiste generalmente en un esqueleto biantenarico principal compuesto por dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc), tres residuos de manosa y normalmente contiene un residuo de fucosa. Ambos brazos de la estructura biantenarica están definidos por enlaces manosa  $\alpha$ 1,3 y  $\alpha$ 1,6 que pueden extenderse aún más con la adición de galactosa y ácido siálico. Las estructuras finales de los glicanos normalmente se pueden dividir, como se muestra en la Figura 8 (Dhara et al., 2018). en tres tipos: con alto contenido de manosa (M9, M8 y M5), híbridas y complejas (G1 y G2).

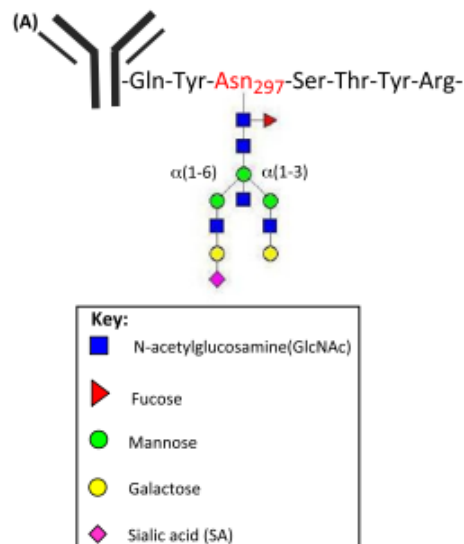


Figura 7 Anticuerpo monoclonal con sitio conservado de glicosilación. Sitio conservado de glicosilación (Asp/X/Ser o Thr). Tomado de (Sha et al. 2016). Se muestran en símbolos cada uno de los azúcares que conforman los grupos de glicanos (fucosa, manosa, galactosa, ácido siálico, N- acetilglucosamina)

Los patrones de glicosilación en los anticuerpos monoclonales son en general heterogéneos y existen dos fuentes principales de variación: la microheterogeneidad, que se relaciona con la diversidad de estructuras de glicanos que se pueden encontrar en el mismo sitio entre una proteína y otra, y la macroheterogeneidad que se refiere a que un sitio del anticuerpo puede o no estar glicosilado. La variabilidad natural de estos patrones representa un reto en la producción de anticuerpos, ya que estos deben ser reproducibles de acuerdo con diferentes especificaciones que son definidas por las autoridades regulatorias puesto que heterogeneidades en el patrón de N-glicosilación puede afectar la función efectora de los AcM (Butler, 2006).

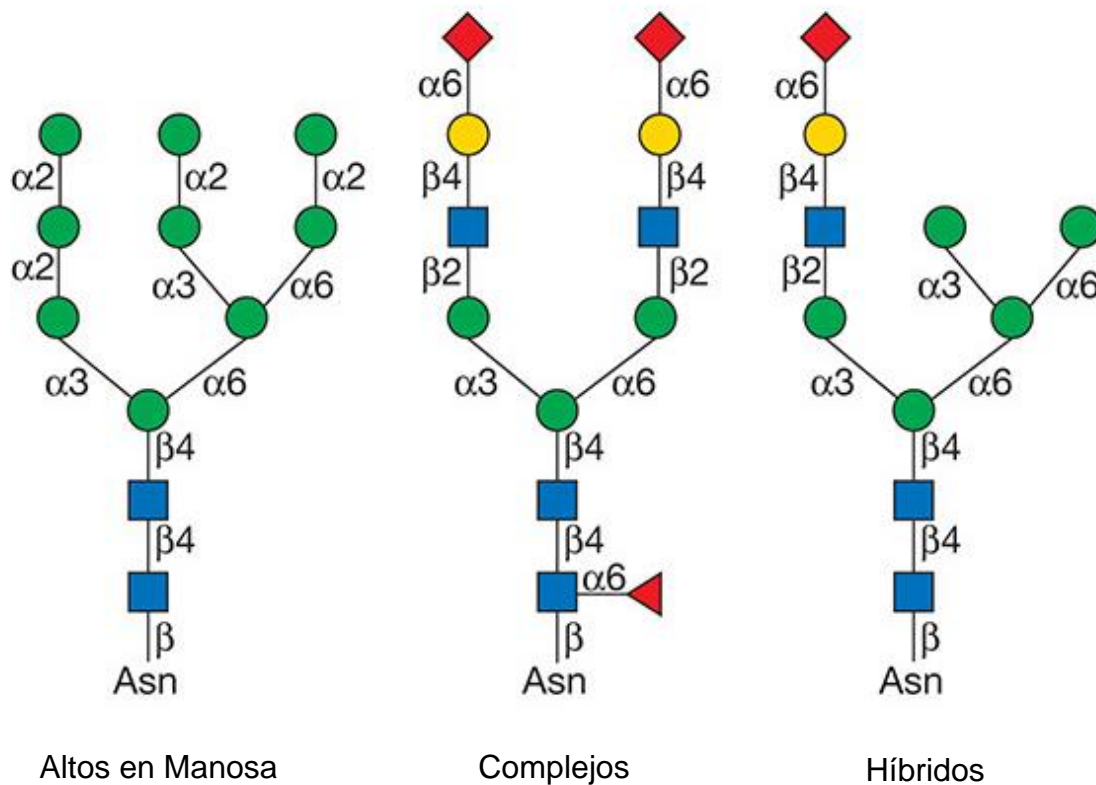


Figura 8 Tipos de N-glicanos. Cada glicano contiene el esqueleto principal (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) compuesto que puede ser elongado con galactosa y ácido siálico. Modificado de (Stanley et. al, 2014)

La presencia o ausencia de ciertos oligosacáridos puede afectar críticamente la estabilidad del AcM, las funciones efectoras, la inmunogenicidad y el tiempo de vida

media en el torrente sanguíneo. Por ejemplo, la disminución de galactosilación terminal, reduce la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la ausencia de fucosilación da como resultado un aumento de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC por sus siglas en inglés); los niveles altos de sialilación, reducen la actividad de ADCC e impactan las respuestas inflamatorias (Hossler et al., 2009).

En la Figura 9, se muestra el proceso de N-glicosilación, el cual inicia con la unión covalente de un glicano de 14 azúcares a la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). El procesamiento de Glc3Man9GlcNAc2Asn comienza con una remoción secuencial de los residuos de Glc por  $\alpha$ -glucosidasas I y II que funcionan en el lumen del RE, posteriormente la  $\alpha$ -manosidasa remueve la manosa terminal de la antena central de Man9GlcNAc2 para formar Man8GlcNAc2 (Varki, 2017). Gracias a las  $\alpha$ 1-2 manosidasas el corte de residuos de manosa continúa en el aparato de Golgi hasta formar Man5GlcNAc2, lo cual es un paso clave en la formación de glicanos híbridos y complejos. La formación de glicanos complejos e híbridos se inicia en el aparato de Golgi medio, en donde una N-acetilglucosaminiltransferasa añade una N-acetilglucosamina al esqueleto Man5GlcNAc2 y subsecuentemente las manosidasas remueven las manosas terminales para formar GlcNAcMan3GlcNAc2. Una vez que ambas manosas fueron removidas, se puede agregar entonces una segunda N-acetilglucosamina, formando el precursor de todos los glicanos complejos. (Varki, 2017). En la etapa de maduración se pueden añadir azúcares al GlcNAc del esqueleto principal o alargarse las antenas con otros residuos de azúcares, la modificación más común para los vertebrados es la adición de una fucosa al GlcNAc del esqueleto principal. La mayoría de los N-glicanos complejos tienen extensiones en las antenas que se forman por la adición de galactosas y por último ácido siálicos ó ácido N-acetilneuramínico (Hossler et al., 2009).

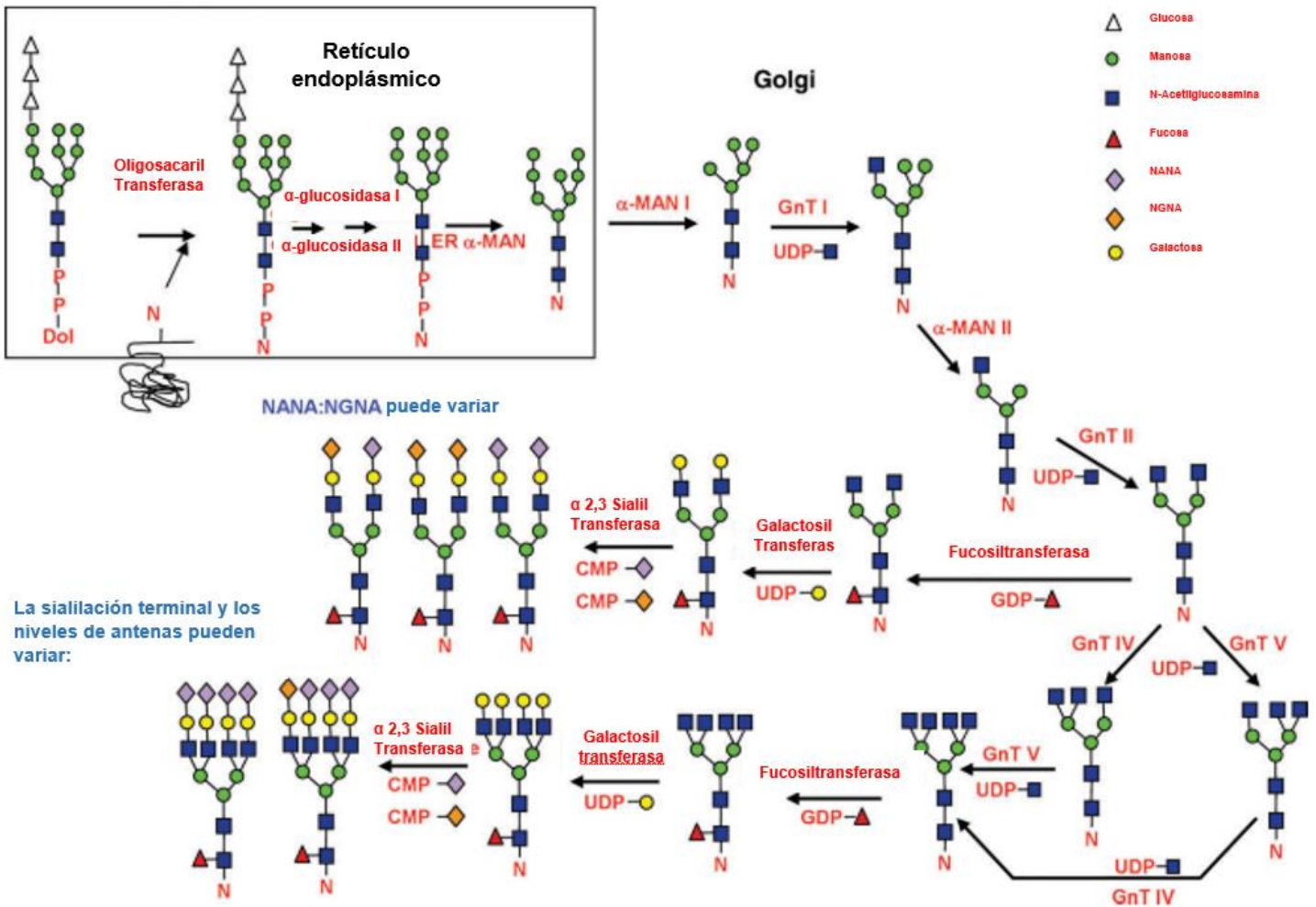


Figura 9 Proceso de glicosilación en células CHO. Las reacciones que se muestran producen un amplio espectro de N-glicanos complejos que pueden diferir en el número de ramificaciones, composición de azúcares, longitud y modificaciones en el esqueleto principal. Dolicol fosfato (Dol-P-P), Manosidasa del retículo endoplásmico (ER α-MAN), Manosidasa I y II (α-MAN I y II), acetilglucosaminil transferasas (GnT I, II, III, IV, V), Uridina fosfato (UDP-X), Guanosina difosfato (GDP). Adaptado de (Hossler et al., 2009).

En comparación con la operación tradicional de cultivos en lotes o lotes alimentados, las condiciones ambientales estables de las células en los cultivos continuos, combinadas con bajos niveles de subproductos y tiempos de residencia bajos debido a la alimentación y cosecha continua de medio de cultivo, resultan en una glicosilación constante del anticuerpo monoclonal. Su cosecha continua, con un patrón de glicosilación deseado y consistente, es beneficioso en vista de las iniciativas regulatorias que restringen el alto grado de variabilidad en los atributos críticos de calidad (Karst, et al., 2017).

Karst, et al., (2017), realizaron cultivos por perfusión a diferentes estados estacionarios en biorreactores instrumentados de volumen de trabajo de 1.5 L y con un dispositivo ATF para la retención celular. En ese estudio se concluyó que en cultivos con 26 días de duración con aproximadamente  $40 \times 10^6$  cel/mL y después de haber equilibrado las concentraciones de metabolitos, el patrón de N-glicosilación del anticuerpo monoclonal producido permaneció sin variaciones ya que se mantuvo un estado estacionario estable, tal y como se muestra en la figura 10.

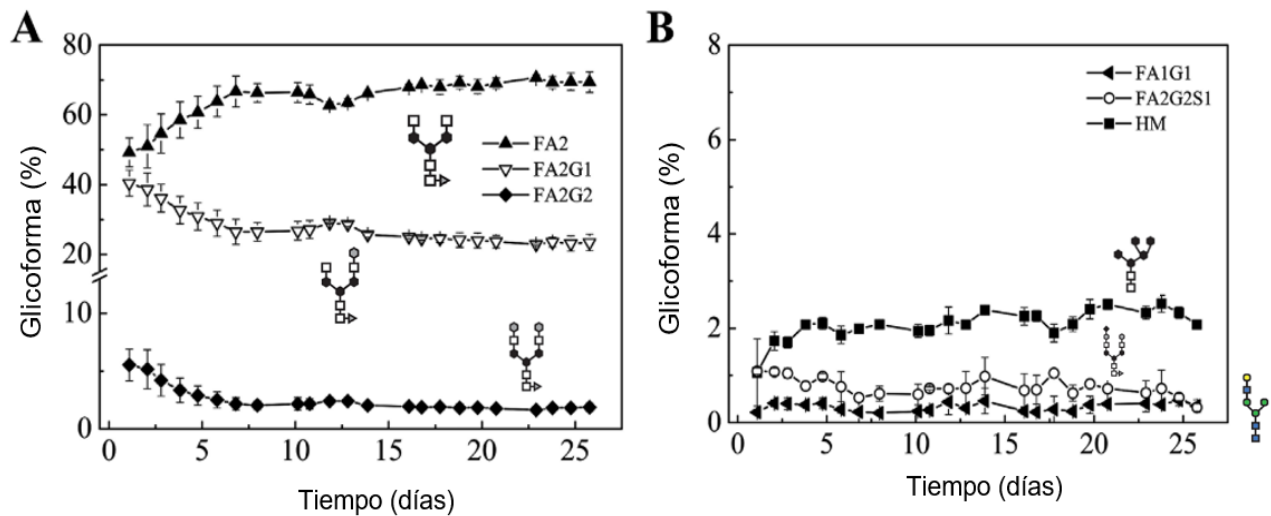


Figura 10 Glicosilación constante en el tiempo en cultivos por perfusión. Adaptado de (Karst et al., 2017). FA2 Glicanos fucosilados, FA2G1 glicanos fucosilados y con una galactosa, FA2G2 Glicanos fucosilados y con dos galactosas, HM altos en manosa, FA2G2S1 glicanos fucosilados, dos galactosas y un ácido siálico

Glicosilación constante en el tiempo en cultivos por perfusión. Adaptado de (Karst et al., 2017). FA2 Glicanos fucosilados, FA2G1 glicanos fucosilados y con una galactosa, FA2G2 Glicanos fucosilados y con dos galactosas, HM altos en manosa, FA2G2S1 glicanos fucosilados, dos galactosas y un ácido siálico

Por otro lado, aunque se monitore y controle con precisión las concentraciones celulares y tasas de perfusión, es posible que pequeñas perturbaciones en variables clave del proceso y factores intrínsecos de las células, como su metabolismo y expresión génica, afecten los patrones de glicosilación. Sin embargo, en el estudio anterior, a pesar de los efectos adversos, los cambios de cada una de las fracciones de glicanos observados en el estado estacionario en los cultivos de perfusión, no superan el 3% entre cada una de las lecturas, para las tres formas principales, que

son FA2G0, FA2G1 y FA2G2 que, en comparación, con los cultivos de lote alimentado, estas variaciones pueden superar el 20% para las formas principales en un periodo de 10 días (Villiger et al. 2016).

#### 3.4.2 Variantes de carga o Isoformas

La existencia de múltiples variantes con diferencias en carga, peso molecular u otras propiedades son comunes en AcM. Durante el proceso de fabricación, se producen variaciones que contribuyen a la heterogeneidad en tamaño, carga y otros parámetros de la molécula debido a procesos enzimáticos, degradación o modificaciones espontáneas (Du et al., 2012). Los AcM sufren degradación química a través de diversos mecanismos que incluyen oxidación, desaminación, isomerización y fragmentación que dan como resultado la formación de diversas variantes de carga. Las variantes de carga generalmente se refieren a ácidas o básicas comparadas con las especies principales. Cuando los AcM son analizados por cromatografía de intercambio catiónico, las variantes ácidas eluyen antes que el pico principal y las variantes básicas eluyen después del pico principal (Du et al., 2012). Las variantes ácidas son típicamente la suma de variantes de AcM no relacionadas que contienen varios grados de sialilación, desaminación y glicación de Asn, mientras que las especies básicas se forman principalmente debido a Gln N-terminal no ciclada, presencia de lisina C-terminal y amidación C-terminal (Ambrogelly et al., 2018; Khawli et al., 2010).

La heterogeneidad de cargas tiene un efecto sustancial sobre las propiedades funcionales del anticuerpo, ya que puede modificar su estructura, estabilidad, propiedades químicas y afinidad de unión a sus receptores (Khawli et al., 2010). Cada uno de los efectos de las variaciones de carga dependen de la localización y grado de las modificaciones. La principal causa de la generación de variantes de carga ácidas es la desamidación de la asparagina, sin embargo, otros mecanismos como la glicación, sialilación o cisteinilación también son responsables de la formación de variantes ácidas (Du et al. 2012). En cuanto a la formación de variantes básicas, la mayor razón de la formación de éstas es la remoción

incompleta de lisinas C-terminales por acción de las carboxipeptidasas. La remoción incompleta de estas lisinas C-terminales resulta en anticuerpos con cero, uno o dos residuos terminales de lisina que aportan cargas positivas. Otra de las modificaciones comunes para la formación de variantes básicas es la ciclización incompleta de la glutamina amino terminal, oxidación de metionina, isomerización de aspartato, amidación de prolina después de la remoción de lisina C-terminal, entre otras (Du et al. 2012).

En la Figura 11 y Tabla 1 se muestran las modificaciones más comunes en cuanto a la formación de variantes de carga.

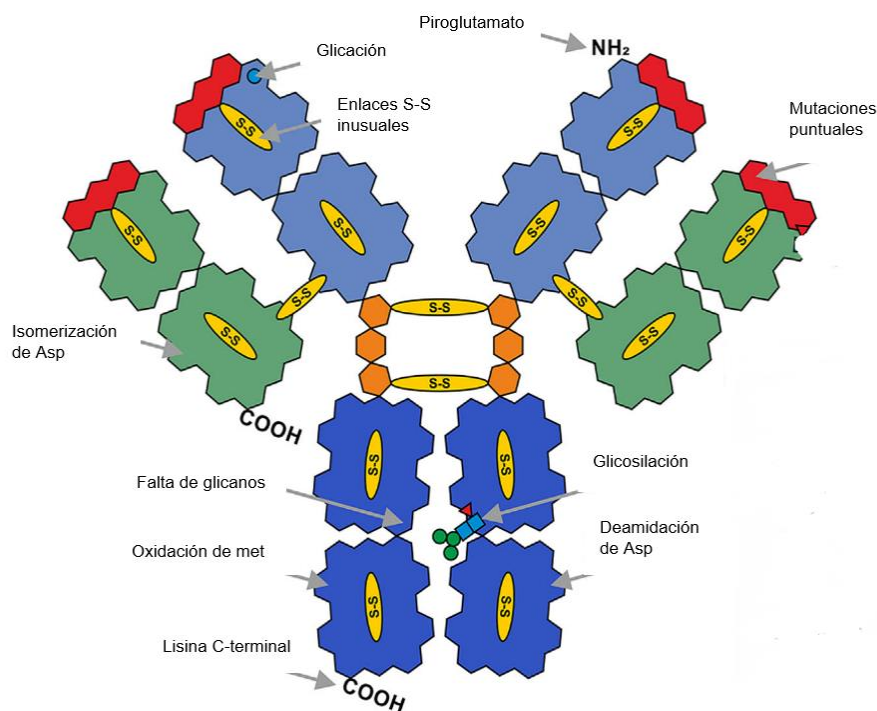


Figura 11 Modificaciones que generan variantes de carga de un AcM. Adaptado de B. Beyer et al. 2018

Tabla 1. Modificaciones más frecuentes que forman variantes ácidas y básicas de un AcM. Adaptado de (F. Torkashvand et. al, 2017).

	<i>Variantes ácidas</i>	<i>Variantes básicas</i>
1	Deamidación	Presencia de lisinas C-terminal
2	Enlaces disulfuro inusuales	Isomerización de Asp
3	Glicación	Oxidación de metionina
4	Ácido Siálico	Glu N-terminal



La mitigación de la agregación y fragmentación de los anticuerpos dentro de los cultivos de perfusión es resultado de un tiempo corto de residencia del producto en el biorreactor, lo que reduce considerablemente la exposición del producto a proteasas endógenas, minimizando así algunas posibles modificaciones postraduccionales, como lo son la desamidación, ciclización de glutamina y eliminación de las lisinas C-terminales que resultan en generación de variantes de carga ácidas y básicas (Qin et al., 2022). El porcentaje de variante de cargas cuando es analizado por métodos basados en cromatografías es definido basado en los tiempos de retención relativos al pico principal.

A través de la técnica de electroforesis capilar de isoelectroenfoque, Qin et al. (2022) midieron las variantes de carga en cultivos controles (lote alimentado) y cultivos de perfusión en un biorreactor de 3 L, con un volumen de trabajo de 1.8 L, una tasa de perfusión que varió entre 1 y 1.2 d<sup>-1</sup> y 23 días de cultivo. Las muestras para electroforesis capilar se tomaron a los días 10, 14, 18, 20 y 23 de cultivo. Encontraron que el porcentaje del pico principal para la muestra de lote alimentado fue de 40.4%, mientras que para el cultivo en perfusión intensificada fue del 74.9-79.7%, tal y como se muestra en la figura 12. Para las variantes ácidas se obtuvieron 44.5% y 12.8-20.8% para lotes alimentados y perfusión respectivamente, en cuanto a las variantes básicas se obtuvo 15.1% y de 3.3-11.0%, respectivamente. Las isoformas ácidas y básicas disminuyeron al menos un 53% y un 27%, respectivamente, en los cultivos de perfusión intensificada en comparación con los cultivos realizados por lote alimentado.

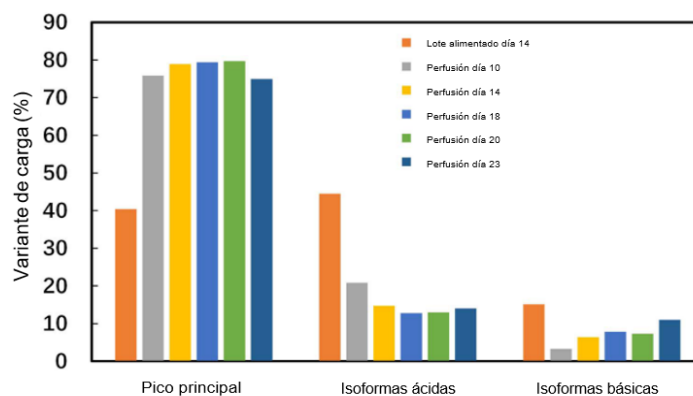


Figura 12 Comparación de perfil de isoformas para lote alimentado y para perfusión en cosecha de día 10, 14, 18, 20 y 23. Adaptado de (Qin et al., 2022). Se obtiene mayor pico principal en los cultivos por perfusión (40% en promedio) y 53 y 27% menos variantes de carga ácidas y básicas respectivamente.



## **4. Justificación**

En nuestro grupo de investigación se desarrolló un proceso, transferido a una empresa farmacéutica nacional, Laboratorios Liomont S.A. de C.V, para fabricar un anticuerpo monoclonal. Ese proceso está basado en un cultivo por lote alimentado, que genera un producto de calidad específica y deseada y se ejecuta en una planta de fabricación de características fijas. En el presente proyecto se pretende ofrecer una opción al proceso de cultivo a uno por perfusión con el fin de aumentar la producción en la planta actual. Para esto, es necesario definir un proceso por perfusión, que genere un anticuerpo de la calidad equivalente al proceso original de lote alimentado, pero que aumente la cantidad global de producto fabricado, empleando la misma instalación y misma escala de biorreactor con solo adaptaciones menores.

## **5. Hipótesis**

Es posible encontrar un espacio de diseño de un cultivo por perfusión, en el que se pueda aumentar la productividad de AcM entre 3 o 4 veces con respecto a un lote alimentado, sin necesidad de utilizar mayor volumen de biorreactor y manteniendo la misma calidad de producto.

## **6. Objetivo General**

En un modelo de perfusión intermitente de células CHO, determinar el efecto de la tasa de perfusión sobre la productividad y calidad de un AcM, y parámetros cinéticos y estequiométricos como indicadores del desempeño del proceso en comparación con cultivos por lote alimentado

### **6.1 Objetivos específicos**

- Establecer un modelo de cultivo en matraces para simular un proceso de perfusión continuo mediante una perfusión intermitente.
- Evaluar la productividad volumétrica de un AcM producido en el sistema modelo de cultivo por perfusión y comparar con respecto al cultivo de referencia por lote alimentado.
- Obtener en cultivos modelo de perfusión en matraces los parámetros cinéticos y estequiométricos y determinar el efecto de la tasa de perfusión y demás variables del proceso necesarios para un escalamiento futuro a un volumen de al menos 200 L.
- Determinar en cultivos modelo de perfusión en matraces la calidad del AcM producido y compararlo con el obtenido a través de un proceso en lote alimentado.
- Explorar el uso de un separador acústico como opción de retención de células en cultivos formales de perfusión en biorreactores instrumentados.

## **7. Metodología**

### **7.1 Línea celular y medio de cultivo**

Se empleó una línea de células CHO, propiedad de una industria farmacéutica nacional productora de un AcM terapéutico, Laboratorios Liomont S.A de C.V. El proyecto se enmarcó en un convenio de colaboración entre el IBT-UNAM y dicha empresa, por lo que detalles de la línea celular productora y AcM producido son de carácter restringido. Para fines prácticos de este proyecto, se denominó a esta clona como "Clona  $\alpha$ ". Se utilizó un medio de cultivo químicamente definido libre de suero formulado para perfusión (medio B) y el medio de cultivo base (medio para cultivo lote alimentado, medio A) en el cual se propagaron las células (detalles no declarados por confidencialidad), además de un tercer medio de cultivo también formulado especialmente para perfusión (medio C) con el que solo se probó una tasa de perfusión ( $1 \text{ d}^{-1}$ ).

### **7.2 Banco Celular**

Se realizó un banco celular de trabajo a partir de un subcultivo en pase 10. Como criterio para la generación del banco celular, se emplearon cultivos con viabilidades entre 95.0 a 100% y concentraciones celulares entre  $1.6$  a  $4.0 \times 10^6$  cel/mL. Una vez cumplidos estos requisitos se realizó el cálculo de número de células requeridas y el volumen requerido de la última propagación para la realización del banco de trabajo. Se preparó el medio de congelación con 45% del medio acondicionado, 45% de medio fresco y 10% de DMSO. Posteriormente se centrifugó a 800 rpm por 5 min el volumen requerido de la última propagación; se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en el medio de congelación. Se llenaron crioviales, previamente etiquetados, con 1mL de suspensión celular a una concentración de  $10 \times 10^6$  cel/mL y se resguardaron en un criotank con nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo.

### 7.3.1 Cultivos por lote alimentado y perfusión en matraces

Se realizaron 2 cultivos en modo lote alimentado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen inicial de 50 mL con medio de cultivo A suplementado con glutamina. Los cultivos por lote alimentado fueron alimentados por pulsos, manualmente de acuerdo con el criterio preestablecido para esta clona (no declarado por confidencialidad), calculando la cantidad de glucosa, aminoácidos y una solución de nutrientes designada como “*feed*” para alimentar. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora Eppendorf New Brunswick 541i a 130 rpm a 37°C y una concentración de 5% de CO<sub>2</sub>.

Se realizaron 7 cultivos en modo perfusión intermitente en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de trabajo de 50 mL cada uno. Se denominaron cultivos de perfusión “intermitente” debido a que no fueron propiamente cultivos continuos puesto que el recambio de medio de cultivo se realizaba de forma discontinua y manual diariamente. Para cada uno de estos cultivos se descongeló un vial del banco celular de trabajo en un volumen de 50 mL en medio A suplementado con glutamina, posteriormente se establecieron los cultivos en matraces a una concentración celular inicial de  $0.3 \times 10^6$  cel/mL. Para los cultivos por perfusión se utilizaron dos estrategias de cultivo. En la primer estrategia se utilizó el medio de cultivo convencional (Medio A) suplementado con glutamina tanto para la expansión de las células como para el desarrollo del cultivo en perfusión. En la segunda, la propagación celular se realizó en el medio A mientras que para el desarrollo de la etapa de perfusión se empleó medio especial para perfusión (medio B) igualmente suplementado con glutamina. Con el medio C solamente se probó la tasa de perfusión de  $1 \text{ d}^{-1}$ . La retención celular se realizó centrifugando diariamente el cultivo a 2000 rcf durante 5 minutos, seguido de la resuspensión del pellet celular en medio de cultivo fresco. La cantidad de medio de cultivo cosechada y alimentada dependió de la tasa de perfusión. Cuando la tasa de perfusión era de  $1 \text{ d}^{-1}$ , significó que se recambió 100% del medio de cultivo por medio de cultivo fresco, cuando era de  $0.75 \text{ d}^{-1}$ , se recambió por medio fresco 75% del sobrenadante después de la centrifugación y cuando era de  $0.5 \text{ d}^{-1}$  se recambió el 50% del medio metabolizado

por medio fresco y se quedaba en el cultivo 50% del medio metabolizado. El medio de cultivo metabolizado se recuperó diariamente como cosecha. Las tasas de perfusión intermitentes fueron de 1, 0.75 y 0.5 d<sup>-1</sup> estas tasas de perfusión se escogieron con el fin de realizar un barrido con tasas de perfusión bajas con base en la velocidad específica de crecimiento de las células. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora Eppendorf New Brunswick 541i a 130 rpm a 37°C y una concentración de 5% de CO<sub>2</sub>.

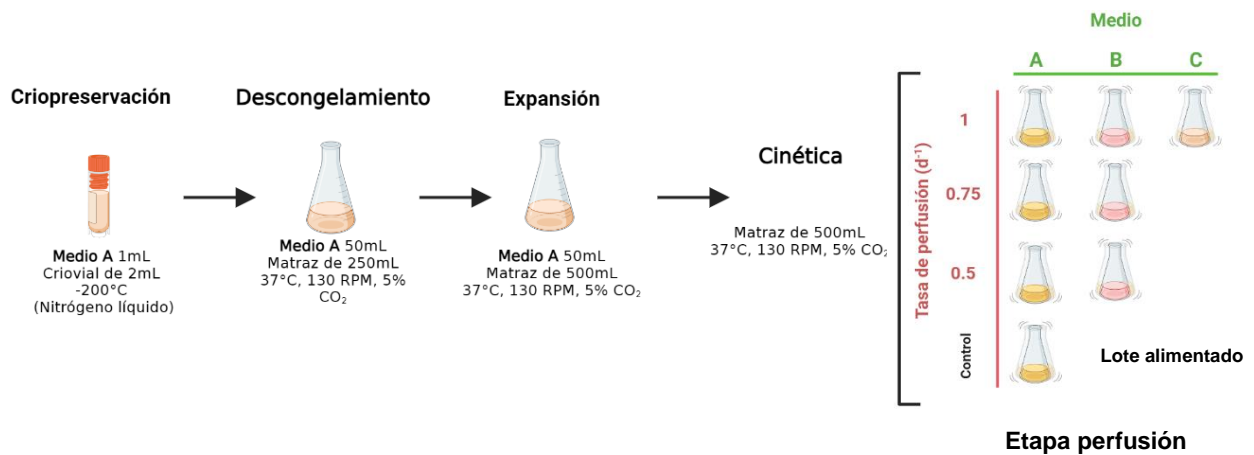


Figura 13 Tren de trabajo para cultivos en modo perfusión intermitente. Se realizaron 3 cultivos con el medio A, 3 cultivos con el medio B y uno con el medio C, el control mostrado es el cultivo de lote alimentado.

### 7.3.2 Cultivos por perfusión en biorreactores instrumentados

Para el desarrollo de esta tesis se seleccionó, de entre todas las opciones disponibles, un separador acústico como dispositivo de retención celular para cultivos en biorreactor instrumentado. Se utilizó un volumen de trabajo de 500mL de cultivo en biorreactor New Brunswick Bioflo CelliGen 115 (Eppendorf) de 1L con una tasa de perfusión de 0.75 d<sup>-1</sup> y medio de cultivo A. La instrumentación contaba con controles de temperatura, agitación, oxígeno disuelto y pH. El biorreactor contaba con la siguiente distribución de la tapa:

**Diagrama de tapa de Biorreactor para cultivo de células CHO por perfusión con separador acústico Mini BioSep, Applikon**

Enero 2023

MLM, MAC

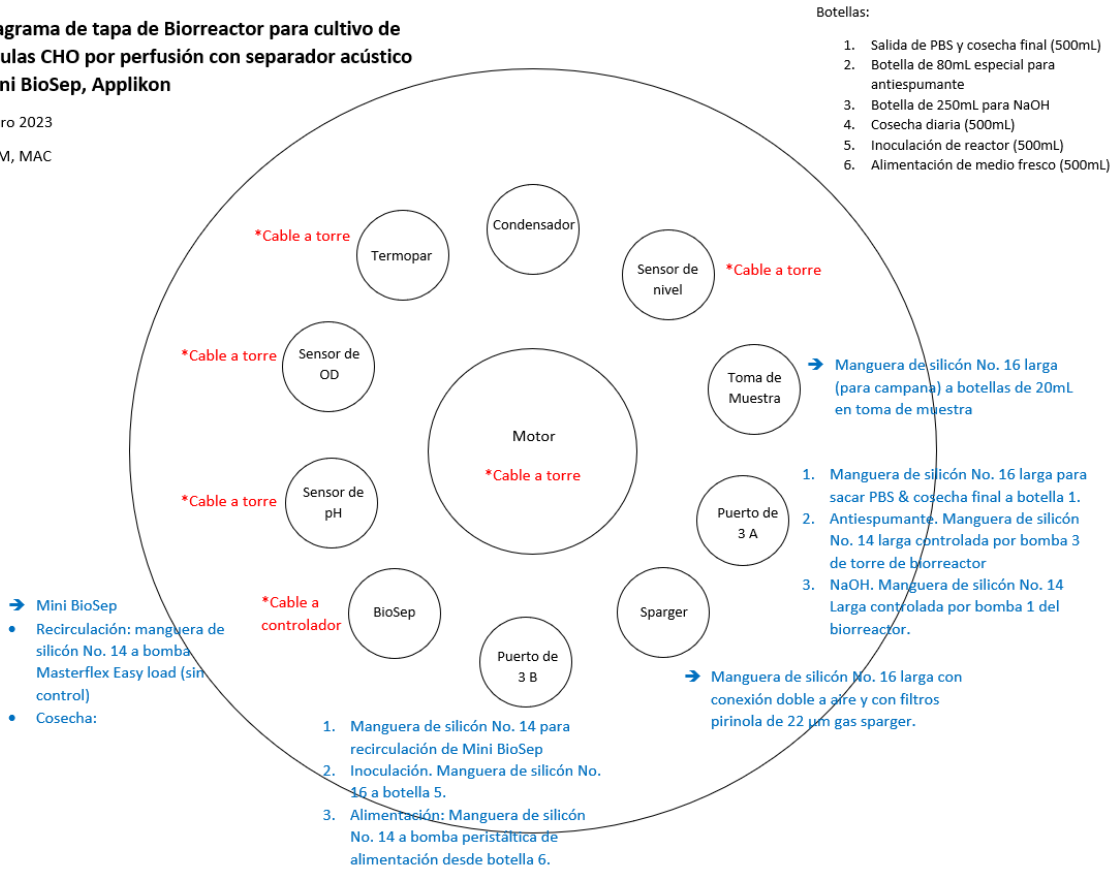


Figura 14. Diagrama de tapa de biorreactor para cultivo de células CHO por perfusión con separador acústico. Se muestra en color azul cada línea que sale de cada puerto y en color rojo los cables correspondientes de cada censo conectados a la torre de control.

La organización del dispositivo de separación celular, bombas y controlador para llevar a cabo los cultivos se muestra en la figura 15 y 16.

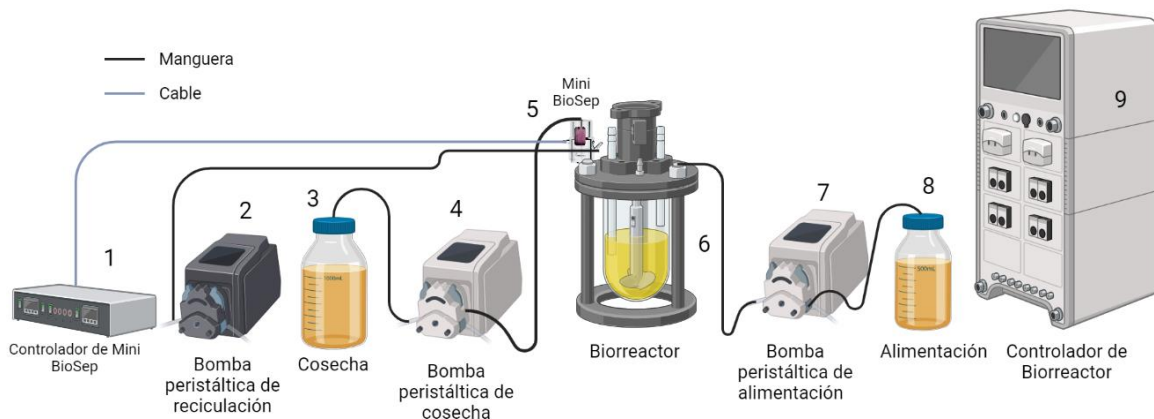


Figura 15 Organización de componentes para cultivo en perfusión



Figura 16 Organización de biorreactor para operación en modo perfusión

La numeración de la Figura 16 corresponde a: 1, controlador de Mini BioSep para control de tiempo de corrida “Run Time”, tiempo de paro “Stop” y potencia “Power”. 2, bomba peristáltica Masterflex sin control de flujo para recirculación de medio través del dispositivo Mini BioSep. Esta bomba mantiene la cámara del dispositivo siempre llena de cultivo para que este opere sin dañar el equipo. 3, frasco estéril de cosecha de medio de cultivo metabolizado y con el AcM producido. Este frasco se cambia diariamente en condiciones de esterilidad. 4, bomba peristáltica Masterflex 07525-20 con control de flujo para cosecha. El flujo manejado fue de 0.260 mL/min para una tasa de perfusión de 0.75 d<sup>-1</sup>. 5 sistema de retención celular Mini BioSep 1 L/día. Este dispositivo consiste en una pieza que se monta a la tapa del biorreactor con 3 puertos exteriores y una línea dentro del biorreactor como se muestra en la figura 17. 6, biorreactor instrumentado con volumen de trabajo de 500mL. 7, bomba de alimentación Watson Marlow 101F controlada a 04 para obtener un flujo de ≈

0.26 mL/min (para mantener una tasa de perfusión de 0.75 d<sup>-1</sup>). 8, botella de 500mL con medio de cultivo estéril para alimentar el reactor. Esta botella es intercambiada diariamente con medio fresco en condiciones de esterilidad. 9, torre de control de Biorreactor New Brunswick Bioflo CelliGen 115 (Eppendorf) empleada para mantener los parámetros en los valores mostrados en la tabla 2.

Tabla 2 Parámetros para cultivos en biorreactor en perfusión

Parámetro	Setpoint	Mecanismo de control
Oxígeno disuelto	30%	Aire, N <sub>2</sub> y O <sub>2</sub>
pH	7.2	CO <sub>2</sub> y NaOH
Temperatura	37.0	Chaqueta térmica
Agitación	130	Propela marina



Figura 17 Dispositivo de retención celular Mini BioSep 1 L/día



En la figura 17 se muestran los componentes y las líneas que se conectan al Mini BioSep. El puerto A consta de un cable que va conectado al controlador del Mini BioSep (1). El puerto B se conecta a una línea de manguera #14 Masterflex la cual pasa por la bomba de cosecha y de ahí a la botella de cosecha que contiene medio de cultivo metabolizado clarificado y el AcM producido. La salida C es la línea que entra al biorreactor para, a través de la bomba Masterflex sin control de flujo, recircular el cultivo por el dispositivo a través del puerto D y la cámara del dispositivo nunca se quede seca. La letra E indica la cámara de separación de células mediante ondas acústicas. Las ondas acústicas inmovilizan las células que se encuentran en el medio de cultivo generando aglomerados en líneas verticales como se muestra en la figura 17 por lo que, a la salida del puerto B, el medio de cultivo sale prácticamente libre de células.

## 7.4 Determinación de concentración celular, viabilidad y metabolitos

### 7.4.1 Concentración celular y viabilidad

La concentración celular y viabilidad se cuantificaron a través del conteo en cámara de Neubauer y exclusión por azul de tripano al 20% en buffer PBS y empleando un microscopio óptico Micromaster con un objetivo 10x. Las células viables se observan en el microscopio como aquellas sin coloración mientras que las no viables se observan de color azul. Se realizaron las diluciones necesarias para contar entre 100 a 500 células en 10 cuadrantes de la cámara de Neubauer (cuadrantes superior e inferior derecho e izquierdo y cuadrante central de ambos lados de la cámara). Se determinó la concentración de células y su viabilidad a través de la siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración de células viables} = \frac{\text{Conteo de células}}{10 \text{ cuadrantes}} * \text{Dilución} * 10,000 \left( \frac{10^6 \text{ cel}}{\text{mL}} \right)$$

..... (10)

$$Viabilidad = \frac{Células\ viables}{Células\ totales} * 100 \dots\dots\dots (11)$$

#### 7.4.2 Análisis de metabolitos

Para todos los cultivos se recolectó una muestra de entre 0.5 a 1 mL antes y después de cada recambio durante todo el cultivo. Estas muestras fueron centrifugadas a 9430 rcf por 5 minutos para sedimentar las células y posteriormente recuperar el sobrenadante, el cual fue almacenado a -20°C. Las muestras fueron descongeladas para medición de glucosa, lactato, glutamina y glutamato a través de un analizador bioquímico YSI 2950 (*YSI Instruments*).

#### 7.4.3 Cuantificación de anticuerpo monoclonal en muestras de cultivo por HPLC

Para determinar la concentración de anticuerpo monoclonal, se emplearon muestras de 1mL de sobrenadante para cada tiempo. La muestra se preparó centrifugando a 9430 rcf por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente la muestra se filtró con Acrodiscos de GHP 0.22 µm (PALL) con ayuda de un jeringa de 1mL en viales de vidrio con tapa y se analizaron por cromatografía de afinidad a proteína A (*MabPac Protein A, Thermo Scientific*) en un sistema de HPLC con bomba binaria y un detector PDA (Waters). Primero se realizó la curva estándar de AcM con una serie de diluciones en agua MQ de un anticuerpo purificado y en buen estado (AcM de referencia) a una concentración de 1.5 mg/mL. Se inyectaron al menos 6 cantidades de anticuerpo diferentes según la cantidad esperada de anticuerpo, para lote alimentado se realizó una curva de calibración desde 5 hasta 100 µg de proteína, se integró y se obtuvo el área del pico correspondiente al AcM de cada una de las inyecciones del estándar. Se obtuvo la curva estándar al graficar área vs masa de AcM inyectado. Se determinó la concentración exacta de esta dilución a 280nm en un equipo NanoDrop y se leyó por triplicado. Para preparar el equipo se purgó con agua MQ cada línea con la función *wet prime* por 3 min a un flujo de 8 mL/min, posteriormente se estableció un flujo de 0.5 mL/min y se lavó el sistema cromatográfico con 50% del buffer de

equilibrio (A) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ , ACN pH 7.45) y de almacenamiento (C) (PBS + azida de sodio pH 7.45) por 20 min, se purgaron las líneas A y C independientemente por 3 min a un flujo de 8 mL/min. Se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra con la jeringa de vidrio y se definió un tiempo de corrida de 8 min. Para obtener los cromatogramas la detección se realizó con un detector de PDA a una longitud de onda de 280 nm. Una vez obtenido el cromatograma, el programa obtuvo el área bajo la curva de las muestras y determinó la concentración de anticuerpo con las siguientes ecuaciones:

$$\mu\text{g de AcM} = \frac{\text{área} + b}{m}$$

$$[\text{AcM}] = \frac{\mu\text{g de AcM}}{\text{Volumen de inyección}}$$

Donde:

Área: es el área bajo la curva calculada para cada pico del cromatograma

B = ordenada al origen de la curva estándar

M = pendiente de la curva estándar

[AcM] = concentración de anticuerpo monoclonal

## 7.5 Purificación y determinación de la calidad del AcM

En este estudio, la calidad del AcM, se definió como su patrón de N-glicosilación y el perfil de variantes de carga para cada modo de cultivo.

Para la purificación del AcM de los cultivos de lote alimentado se cosechó el caldo de cultivo, se centrifugó a 4000 rcf por 10min y el sobrenadante se filtró por 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex- GS MCE, MF, Merck Millipore) para eliminar restos celulares. La purificación se llevó a cabo a partir de cromatografía por afinidad empleando una columna empacada con una resina de proteína A (*ProSep Ultra Plus Media*, Merck). La columna inicialmente se equilibró con 8 volúmenes de columna con un buffer de equilibrio (PBS pH 7.6 con 0.3M de NaCl), posteriormente la muestra a purificar se cargó dos veces en la columna y se lavó con 10 volúmenes de columna de buffer

de equilibrio. La elución del anticuerpo monoclonal se realizó con 4 volúmenes de columna con un buffer de elución (glicina 0.1M pH 3.0) e inmediatamente se ajustó el pH a 7.0 con una solución de Tris base 1M pH 9.0 con 2M de NaCl. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna con buffer de regeneración (ácido fosfórico 150nM) y se guardó con 2 volúmenes de columna de buffer de almacenamiento (acetato de sodio-alcohol bencílico pH 5.2). Una vez purificado, la concentración del AcM se cuantificó en el equipo NanoDrop a una longitud de onda de 280 nm y posteriormente se determinó su perfil de glicosilación y las variantes de carga (Burnouf & Radosevich, 2001).

En cuanto a los cultivos de perfusión intermitente (cultivos modelo), diariamente se cosechó medio de cultivo metabolizado a través de la centrifugación de los 50mL de volumen de trabajo a 2000 rcf por 5 minutos, el sobrenadante se recuperó y almacenó a 4°C en tubos falcon de 50mL por separado. Posteriormente, antes de la purificación, las cosechas diarias se mezclaron en partidas para su posterior análisis de calidad.

Cada una de las partidas se filtró por 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex- GS MCE, MF, Merck Millipore) para eliminar restos celulares y se purificaron 100mL de cada partida utilizando el mismo procedimiento de purificación que para el cultivo de lote alimentado.

#### 7.5.1 Determinación del perfil de N-glicosilación

Para determinar el perfil de N-glicosilación del AcM producido en cada uno de los cultivos, tanto de lote alimentado como de perfusión intermitente, se tomaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína total de muestras previamente purificadas. En el caso de contar con menos de 32.5  $\mu\text{L}$ , entonces el volumen se completó hasta 32.5  $\mu\text{L}$  con agua Mili-Q. Posteriormente se agregaron 2.5  $\mu\text{L}$  de 2% SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol 1M para la desnaturalización del anticuerpo. A continuación, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de IGEPAL al 7% para detener la reacción desnaturalizante. Para remover los N-glicanos se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X para PNGasa, 4  $\mu\text{L}$  de agua Mili-Q y 1  $\mu\text{L}$  de PNGasa

F (1 U/ $\mu$ L, *Elizabethkingia meningosepticum* Merck Millipore). Esta mezcla se incubó a 37°C durante 15h. Posteriormente se realizó la limpieza de los glicanos a través de precipitar impurezas contenidas en 150  $\mu$ L con etanol absoluto frío, se dejó reposar en hielo y se centrifugó a 10,000 rpm por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se llevó a un tubo eppendorf de 0.5mL para concentrar a sequedad en concentrador (SAVANT Speed Vac, SC110A). Una vez seco, se agregaron 5  $\mu$ L de colorante 2-AB (2-aminobenzamida), se resuspendió la solución y se bajó al fondo del tubo centrifugándolo para después incubarlo en un Thermoblock (*Thermomixer, Eppendorf*) durante 2 horas a 65°C, 0 rpm. Posteriormente se agregó 100  $\mu$ L de acetonitrilo al 100% a la muestra. Se colocaron 2 discos de papel Whatman (No.1, 70 mm, Cat No 1001-070, Whatman) en un cartucho de vidrio sobre un tubo Falcon de 50mL, primero se agregó 1mL de agua Mili-Q para hidratar los filtros, posteriormente se realizaron lavados de los filtros con 5mL de ácido acético al 30% y 5mL de acetonitrilo al 100%. Se colocó toda la muestra en el centro del filtro, se agregó 1mL de acetonitrilo 100%, seguido de 5mL de acetonitrilo 96% y al final se eluyeron los glicanos con 2mL de agua Mili-Q sobre un vial con rosca. Posteriormente se concentraron hasta tener un volumen menor a 5  $\mu$ L en el concentrador SAVANT. Posteriormente se diluyó a 100  $\mu$ L con agua Mili-Q. Para el análisis en UPLC, 10  $\mu$ L de la suspensión anterior de glicanos se mezcló con 15  $\mu$ L de acetonitrilo 100% en un tubo eppendorf y los glicanos se recuperaron en un vial con cono. Por último, se realizó la separación por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC por sus siglas en inglés) en UPLC (*ACQUITY UPLC BEH Glycan Amide Column, Waters*). Para la detección por HILIC se realizó una curva de calibración a través de una escalera de glucosa para transformar el tiempo de migración en unidades de glucosa como se menciona en el protocolo de (Guile et al., 1997). La detección de los glicanos se realizó con un detector de fluorescencia Waters a longitudes de onda de 330 nm para excitación y 420 nm de emisión. Se obtuvo el cromatograma, se analizaron los picos, determinando la estructura y su abundancia relativa. Cada una de las estructuras fue agrupada como: Altos en Manosa (5 a 9 manosas terminales), Híbridos (Manosa y N-acetilglucosamina terminal), Fucosilados (Fucosa en el núcleo de quitobiosa), Galactosilados (1 o 2

galactosas terminales), No Galactosilados (G0, N-acetilglucosamina terminal) y Complejos (suma de G0 y galactosilados) (Serrato et al., 2004).

#### 7.5.2 Determinación del perfil de variantes de carga

Las muestras de AcM purificado se llevaron a una concentración de 1.5 µg/µL con buffer pH 7 con 5.5mM HEPES, 4.2mM bicina, 9.5mM CAPSO, 0.8mM CAPS y 6,3mM de NaCl. Se analizaron las muestras por cromatografía de intercambio catiónico (*CEX* por sus siglas en inglés) por HPLC en un gradiente de pH de 7 a 10 (Columna *Dionex Propack WCX 10, ThermoScientific*) y se determinó el porcentaje del área bajo la curva para cada uno de los picos (isoformas ácidas, pico principal e isoformas básicas). El pico principal se definió a partir del pico con mayor área, los picos obtenidos antes de este se definieron como variantes ácidas y los obtenidos después de este como variantes básicas.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Cultivos en modo lote alimentado y perfusión intermitente

Con base en la creciente demanda y la apertura del mercado a biofármacos, que ha dado lugar a la aprobación de más de 100 anticuerpos monoclonales, se han presentado desafíos en la producción industrial para satisfacer la necesidad de millones de dosis para tratar la población mundial. Por lo tanto, las estrategias de producción se ven constantemente retadas para lograr la capacidad de producción masiva, considerando factores como el tamaño de los reactores, la naturaleza de las células productoras, los procesos de producción y purificación de biofármacos (María et al. 2023). Para la producción de anticuerpos monoclonales, el modo de lote alimentado es ampliamente utilizado debido al rápido desarrollo del proceso, confiabilidad, flexibilidad y escalabilidad (Bibila & Robinson, 1995). Sin embargo, el modo de perfusión es utilizado para buscar mejorar la productividad y la calidad del producto, pero la complejidad y duración de los cultivos representan retos ingenieriles importantes para su optimización. Antes de operar biorreactores instrumentados, el desarrollo del proceso se puede realizar preferentemente en sistemas más simples y en pequeña escala con la finalidad de probar de una manera más rápida y económica las múltiples alternativas de cultivos. En esta escala se debe determinar con precisión las características cinéticas de la línea celular durante cultivo por perfusión como, por ejemplo, las velocidades de crecimiento, consumo de nutrientes y formación de productos (Henry et al., 2008).

Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron cultivos en matraces y biorreactores como se describe en la metodología en el punto 7.3.1 y 7.3.2. De los cultivos en perfusión intermitente, 3 se realizaron con el medio de cultivo convencional (medio A), 3 con el medio de cultivo especial para perfusión (medio B) y uno con el medio C, también especial para perfusión. Para cada uno de estos cultivos se descongeló un vial del banco celular de trabajo de la clona  $\alpha$ , se expandió en matraces de 250mL con 30mL de volumen y posteriormente, se realizaron

cinéticas de crecimiento en las que se monitoreó la concentración celular, viabilidad y metabolitos.

Todos los cultivos de perfusión intermitente se llevaron a cabo en matraces agitados de 500 mL con un volumen de trabajo de 50mL. La perfusión intermitente es un sistema de perfusión simplificado que se ejecutó en matraces y la retención celular se realizó a través de la centrifugación diaria del cultivo a 2000 rcf por 5 minutos para sedimentar el pellet celular, recuperándose el sobrenadante como cosecha, resuspendiendo las células en un volumen dado de medio fresco y regresándolas al matraz para continuar con el cultivo (Henry et al., 2008b; Maria et al., 2023). Se realizó el conteo celular y cálculo de viabilidad, además del monitoreo de metabolitos antes y después de realizar el recambio de medio de cultivo. El porcentaje promedio de recuperación celular diaria, después de llevar a cabo el recambio, se muestra en la Tabla 3. El porcentaje medio de recuperación celular nunca llegó a ser del 100%. Se observó una pérdida diaria de células de aproximadamente 10 a 15%. La pérdida de células se dio durante la centrifugación, ya que, para no dañar las células, se usaron bajas velocidades de centrifugación que no permitieron sedimentar completamente todas las células las cuales se perdían al momento de remover el medio gastado y resuspender en el medio fresco. Esta pérdida puede tornarse conveniente ya que puede aprovecharse como remoción celular diaria (*bleeding*) indirecta (Maria et al., 2023).

Tabla 3. Porcentaje promedio de recuperación celular después de la perfusión intermitente.

<i>Cultivo</i>	<i>Porcentaje promedio de recuperación de células (%)</i>
<b>Medio A, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	87.5 ± 7.8
<b>Medio B, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	88.0 ± 2.4
<b>Medio C, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	88.16 ± 6.5
<b>Medio A, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	91.19 ± 6.0
<b>Medio B, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	90.0 ± 6.0
<b>Medio A, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	92.0 ± 6.7
<b>Medio B, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	87.9 ± 10



Durante los últimos años se ha vuelto evidente que el desarrollo de procesos de perfusión económicamente competitivos para la producción de proteínas recombinantes como los AcM depende de nuestra capacidad para reducir drásticamente las tasas de dilución (Konstantinov et al., 2006), manteniendo altas concentraciones celulares y de producto de interés. Con este fin, dentro de este trabajo se probaron 3 tasas de perfusión, 1, 0.75 y 0.5  $d^{-1}$ . Cada una de estas tasas se probó con medio de cultivo A y B, tal y como se muestra en las Figuras 18 y 19. Los datos de crecimiento celular se encuentran normalizados con respecto al valor máximo de lote alimentado, así como el tiempo se encuentra normalizado con respecto al tiempo de duración del lote alimentado. El medio C solo se probó con una tasa de perfusión (1  $d^{-1}$ ) debido a la escasa cantidad de medio que se tenía disponible. Los cultivos en perfusión intermitente fueron iniciados en modo lote y se comenzó con el esquema de perfusión intermitente a partir del tiempo normalizado 0.25. Estas tres tasas de perfusión fueron escogidas en el intervalo de 1, 0.75 y 0.5  $d^{-1}$  con el objetivo de tener una estrategia de alimentación que permitiera la operación a una tasa de perfusión baja mientras que se mantuviera un buen crecimiento celular, viabilidad y productividad específica (Konstantinov et al. 2006).

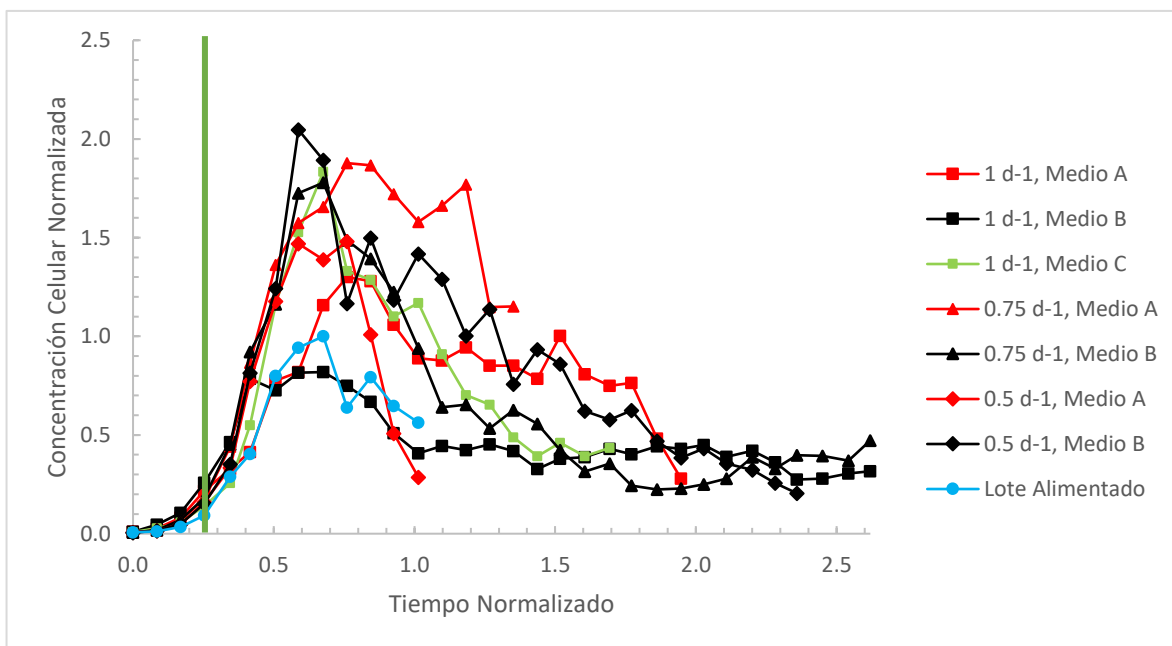


Figura 18 Concentración celular viable lote alimentado (control) y perfusión intermitente a 0.5, 0.75 y 1  $d^{-1}$  en Medio A y B. La barra verde vertical indica el inicio del esquema de perfusión.

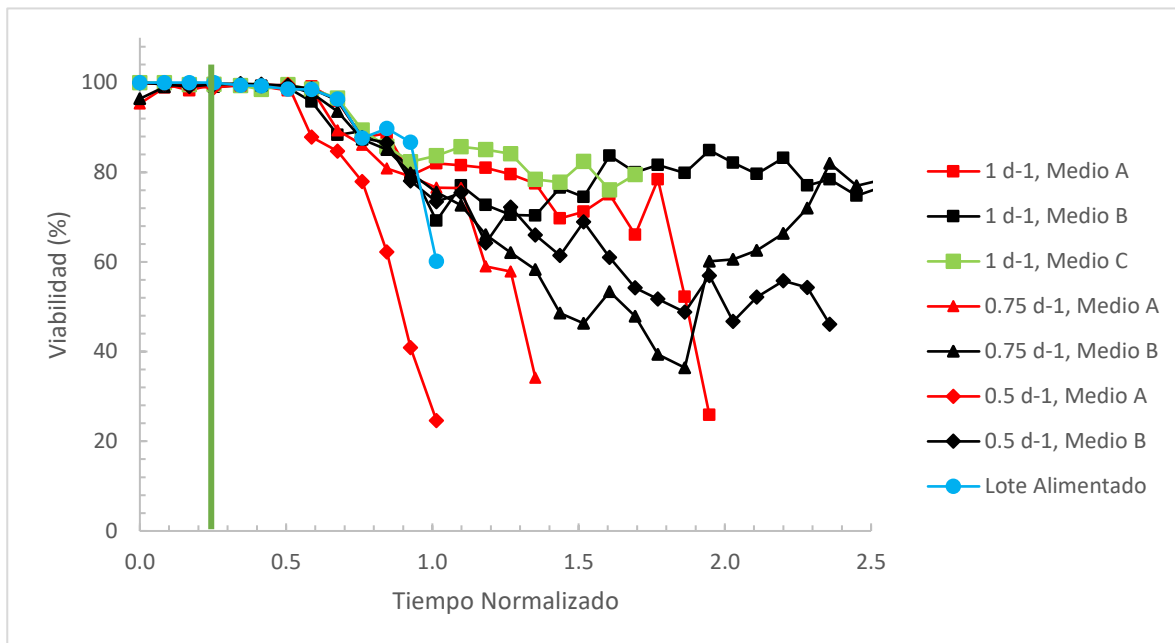


Figura 19 Viabilidad de lote alimentado (control) y perfusión intermitente a 0.5, 0.75 y 1 d-1 en Medio A y B. La barra verde vertical indica el inicio del esquema de perfusión.

Se muestra en las figuras 18 y 19 las diferentes cinéticas de crecimiento a las tasas de perfusión de 0.5, 0.75 y 1 d<sup>-1</sup> y su viabilidad en tres distintos medios de cultivo: medio A (medio convencional) en color rojo, medio B (medio especial para perfusión) en color negro y medio C en color verde. Cada una de las cinéticas se encuentra normalizada con respecto a los valores máximos de concentración celular viable y viabilidad encontrados en el cultivo por lote alimentado. La línea vertical color verde representa el inicio del modo por perfusión. Para el cultivo de células en suspensión Chotteau et al. (2015) mencionan que la perfusión debe de iniciarse cuando las células se encuentran en fase exponencial, asegurándose de que no exista alguna limitante, típicamente a una densidad celular de 1 o 2 x 10<sup>6</sup> cel/mL, en la figura 18 y 19 la línea vertical color verde refleja el inicio del esquema de perfusión. (Chotteau, 2015). Se puede observar que con los cultivos de perfusión se alcanza el doble de la concentración celular viable máxima que se alcanza en los cultivos por lote alimentado y se puede lograr una duración de hasta 2.5 veces más que la del lote alimentado (más adelante se muestran datos con tiempos de duración

inclusive mayores a 2.5 veces la del lote alimentado). Sin embargo, las concentraciones celulares máximas de los cultivos por perfusión no se mantienen y decaen relativamente rápido hasta alcanzar un estado estacionario en valores por debajo del máximo (25 a 50% del máximo obtenido en cultivos por lote alimentado). Es evidente que los cultivos realizados con medio B alcanzaron un estado estacionario más rápido y tuvieron una duración mayor que los cultivos con medio A. Los cultivos con medio A no duraron lo suficiente como para alcanzar estados estacionarios como los cultivos realizados con el medio B y C, ya que la viabilidad decaía más rápido que los cultivos con medio B y se decidió terminarlos cuando la viabilidad bajó de 35%. Un sistema óptimo para el desarrollo de un proceso es el biorreactor instrumentado con un dispositivo de retención celular adecuado para cada proceso. No obstante, para realizar pruebas exploratorias, pruebas de concepto y la predeterminación de parámetros y ensayo de varias condiciones de cultivo, pueden utilizarse distintos sistemas de tamizado inicial. El modelo el aquí mostrado, puede simular un proceso de perfusión formal experimentalmente utilizando matraces agitados y aproximando la perfusión continua por una operación de perfusión intermitente (Maria et al., 2023).

En el sistema en matraces implementado en este trabajo, el cambio de medio se lleva a cabo de manera manual. Mediante esta estrategia se puede alcanzar un estado estacionario en el cultivo, siempre y cuando se realice diariamente una eliminación parcial de células. Sin embargo, si se retienen todas las células, se podría llegar rápidamente a una limitación en cuanto a la transferencia de oxígeno, lo cual se reflejaría en una baja en la viabilidad celular, tal y como se observó en este trabajo para la mayoría de los cultivos para un tiempo normalizado superior a 1. Por lo tanto, se puede suponer que la concentración celular alcanzada en el estado estacionario es aquella en la que no existe limitación por transferencia de masa, ni nutrientes ni subproductos tóxicos. Igualmente, sería de esperarse que, en cultivos reales de perfusión en biorreactores, los resultados sean mejores a los mostrados en la figura 18 simplemente por un mejor control de las variables medioambientales, en particular de la tensión de oxígeno disuelto y pH.

Los estados estacionarios se definieron a partir del análisis del cambio de la velocidad de crecimiento y concentración celular. En la Figura 20 se muestran las velocidades de crecimiento con respecto al tiempo, estas fueron calculadas con la ecuación 9 de la sección 3.1. El estado estacionario se definió cuando se mantuvo la concentración celular, después de alcanzar un máximo, llegó a un valor constante y por ende la velocidad específica de crecimiento fue cero. En el estado estacionario se mantiene también un consumo de nutrientes y producción de anticuerpo monoclonal relativamente constante (Bielser et al., 2018). Los valores negativos en la Figura 20 corresponden a los datos puntuales en que la concentración celular disminuía ligeramente con respecto a la determinación anterior.

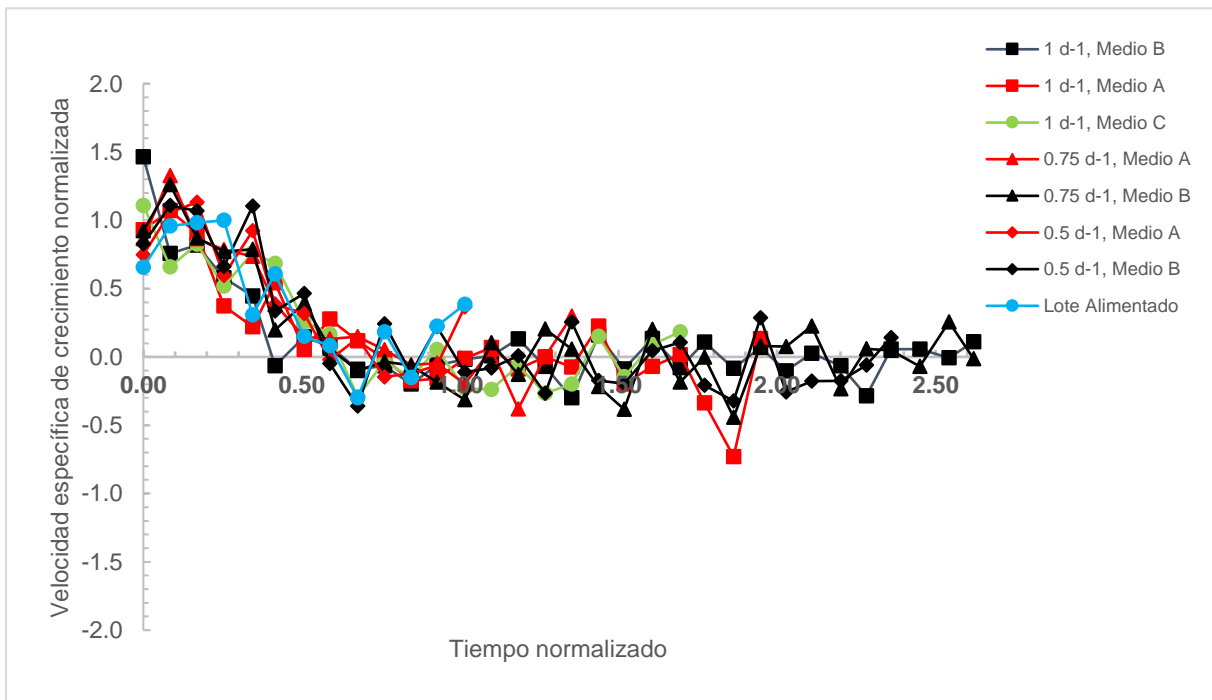


Figura 20 Velocidad específica de crecimiento normalizada para lote alimentado y perfusión intermitente. Los datos fueron normalizados con respecto a lote alimentado.

El cultivo de  $0.75 \text{ d}^{-1}$  con medio B se prolongó después del tiempo 2.5 hasta 4.3 veces la duración de un lote alimentado. Como se observa en las figuras 21 y 22, en este cultivo se probó aumentar de forma escalonada la tasa de perfusión de  $0.75 \text{ d}^{-1}$  a  $2 \text{ d}^{-1}$ . Se demostró con este cultivo que un proceso en perfusión intermitente puede llegar a mantenerse más de 5.6 veces la duración del lote alimentado. La

tasa de perfusión a  $2 \text{ d}^{-1}$  (figuras 21 y 22) se mantuvo 1.5 veces la duración de un lote alimentado y se observó que la concentración celular aumentó de 0.4, pasando por un estado de transición hasta llegar a estabilizarse en 0.6. Igualmente, la viabilidad se incrementó un 20%, demostrándose el impacto favorable que una mayor tasa de perfusión puede tener en el desempeño celular. En cuanto al cultivo en medio C, se logró prolongar hasta 1.69 veces el tiempo del lote alimentado, obteniéndose hacia el final concentraciones celulares similares a las del estado estacionario del cultivo en Medio B a  $0.75 \text{ d}^{-1}$ .

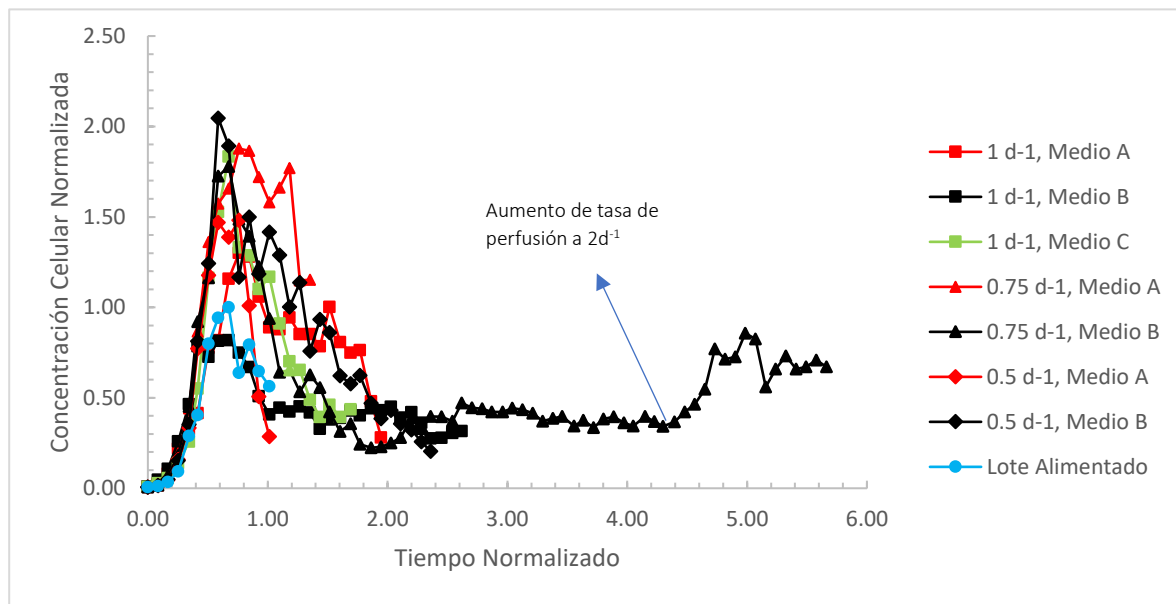


Figura 21 Los cultivos de perfusión pueden llegar a durar hasta 5.6 veces el tiempo de los lotes alimentados.

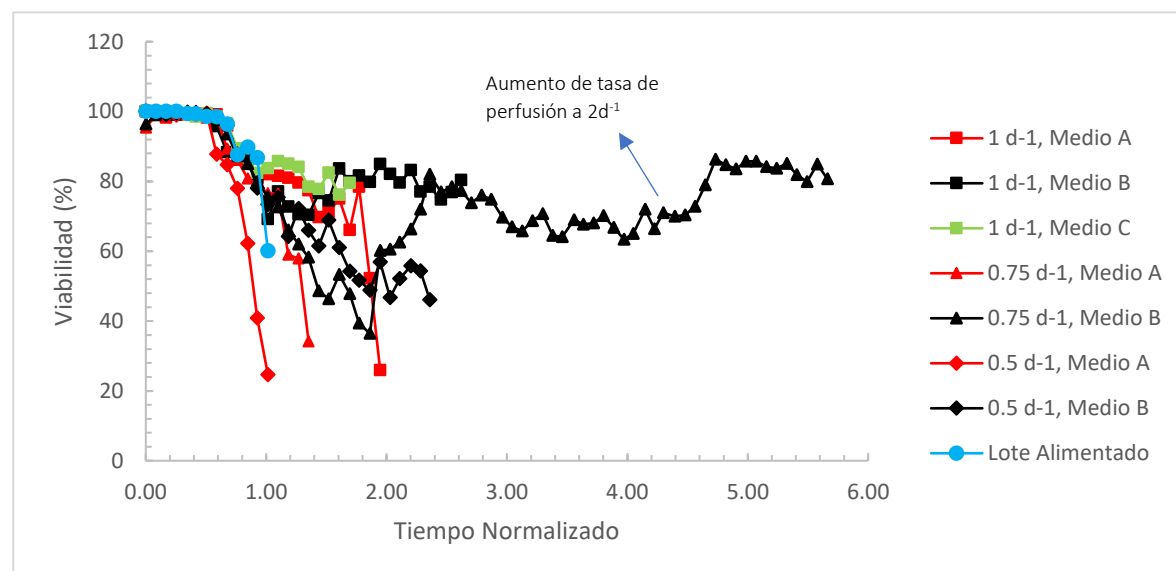


Figura 22 Viabilidad de lote alimentado y de cultivos en perfusión. Los datos se encuentran normalizados con respecto a lote alimentado.

### 8.1.1 Cultivos por perfusión en biorreactores instrumentados

Se realizaron dos cultivos en biorreactores instrumentados a una tasa de perfusión de  $0.75 \text{ d}^{-1}$  con el medio de cultivo A. Para la estandarización de la técnica se escogió realizar los cultivos en biorreactor con el medio A y a la tasa de  $0.75 \text{ d}^{-1}$  debido a la poca disponibilidad de medio B. Los cultivos realizados en biorreactor, al igual que los realizados en matraces, se iniciaron como modo lote y posteriormente se inició el esquema de perfusión a través del encendido del dispositivo de retención celular y recambio de medio de cultivo a una tasa de  $0.75 \text{ d}^{-1}$ . Se realizaron dos cultivos en biorreactores con medio A los cuales no llegaron a estado estacionario ni se llevaron a término debido a problemas técnicos con las bombas de alimentación que se presentaron durante las corridas.

Se muestra en las figuras 23 y 24 la comparación de crecimiento celular en biorreactor 1 y biorreactor 2 donde se observa una buena comparabilidad con los resultados obtenidos en matraz para ese mismo medio y esa misma tasa de perfusión. Para ambas corridas se logró una correspondencia adecuada, al menos hasta el tiempo normalizado de 0.8, entre los cultivos modelo en matraces y los cultivos reales en perfusión. Sin embargo, no se logró llegar a el estado estacionario ya que la viabilidad del cultivo descendió desde el tiempo 0.5 normalizado. Ambos cultivos en biorreactor sufrieron de falta de alimentación a la tasa correcta debido a un problema con la bomba de alimentación que no suministraba medio de cultivo a la misma tasa que cosechaba medio metabolizado, causando que el volumen de trabajo fuera menor a 500 mL y concentrando las células a volúmenes de 400 y hasta 300 mL. Estos problemas de alimentación se vieron reflejados en la viabilidad del cultivo, tal y como se muestra en la figura 24, que a partir del tiempo 0.45 comienza a descender.

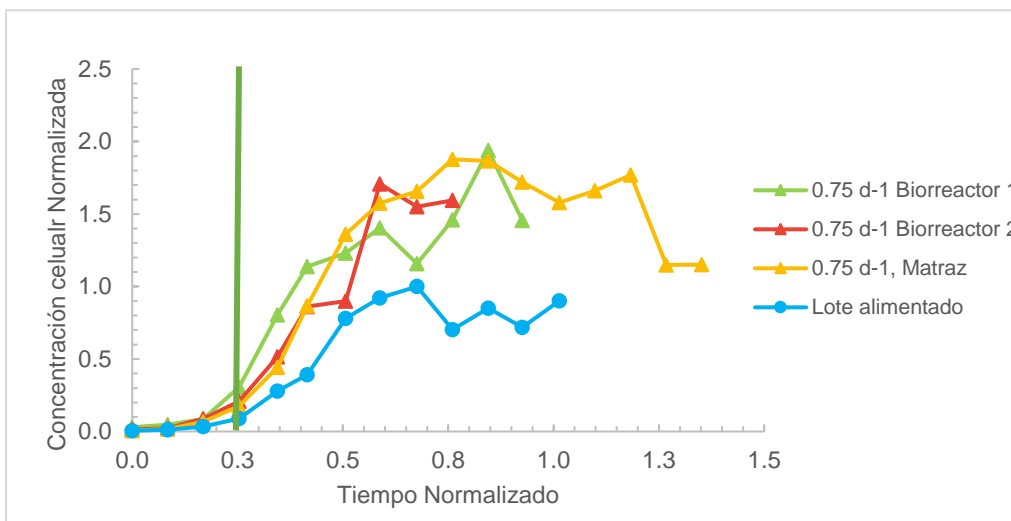


Figura 23 Concentración celular normalizada de biorreactor 1 y 2 en comparación con matraz a la misma tasa de perfusión (0.75 d-1). La barra verde vertical indica el inicio del esquema de perfusión.

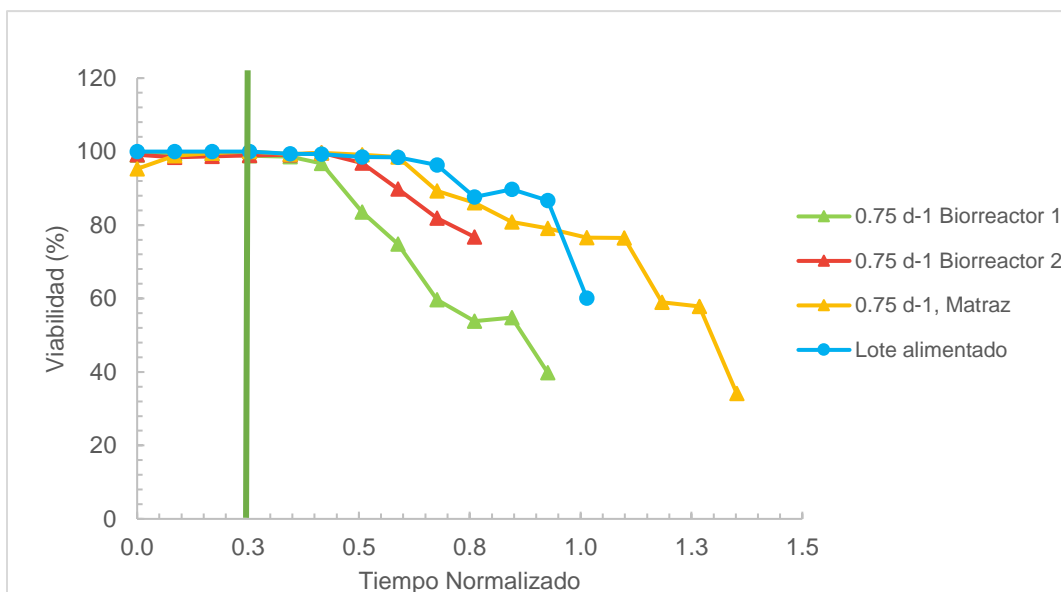


Figura 24 Viabilidad de cultivos en biorreactor en comparación con cultivo en matraz a tasa de 0.75 d-1. La barra verde vertical representa el inicio del esquema de perfusión

## 8.2 Tasa de perfusión específica (CSPR)

Uno de los parámetros más importantes para los sistemas de perfusión es la tasa de perfusión específica o mejor conocida como *cell specific perfusión rate* (CSPR) por sus siglas en inglés, que se define como la cantidad de medio que se alimenta por sola célula por día (Wolf et al. 2019). Para cada medio de cultivo existe un valor crítico de la CSPR por debajo del cual el cultivo no puede sostenerse debido a un crecimiento deficiente, disminución de la productividad específica, degradación del

producto o porque la calidad se ve comprometida. Por lo tanto, el objetivo de optimización de este tipo de procesos es el desarrollo de una estrategia de alimentación que permita la operación del cultivo a una baja tasa de perfusión ( $CSPR_{min}$ ), pero suficientemente alta para mantener un buen crecimiento celular, viabilidad y productividad específica (Wolf et al. 2019; Konstantinov et al. 2006).

En este trabajo se calculó el CSPR para las distintas tasas de perfusión utilizadas ( $1\text{ d}^{-1}$ ,  $0.75\text{ d}^{-1}$  y  $0.5\text{ d}^{-1}$ ) con las ecuaciones 1 y 2 planteadas en la sección 3.1. Se muestran los resultados en la Figura 25, en donde se observa cómo el CSPR cambia en las distintas etapas del cultivo; el estado estacionario está marcado en recuadros azules. El CSPR se puede calcular en cualquier etapa del cultivo, sin embargo, el CSPR que se toma en cuenta para determinar un  $CSPR_{min}$  es aquel que está calculado para cada cultivo con los datos en el estado estacionario, este es más bajo cuando la concentración celular es más alta y después se estabiliza en los valores mostrados en la Tabla 4.



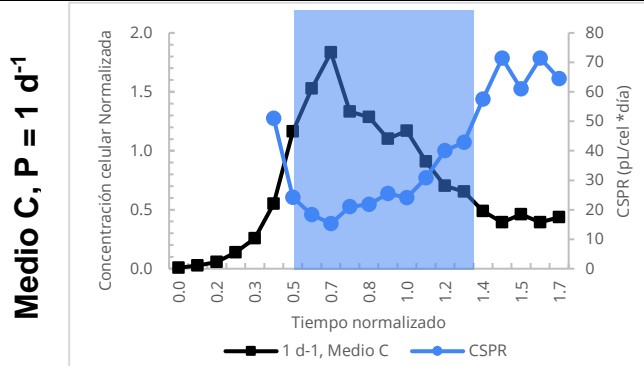
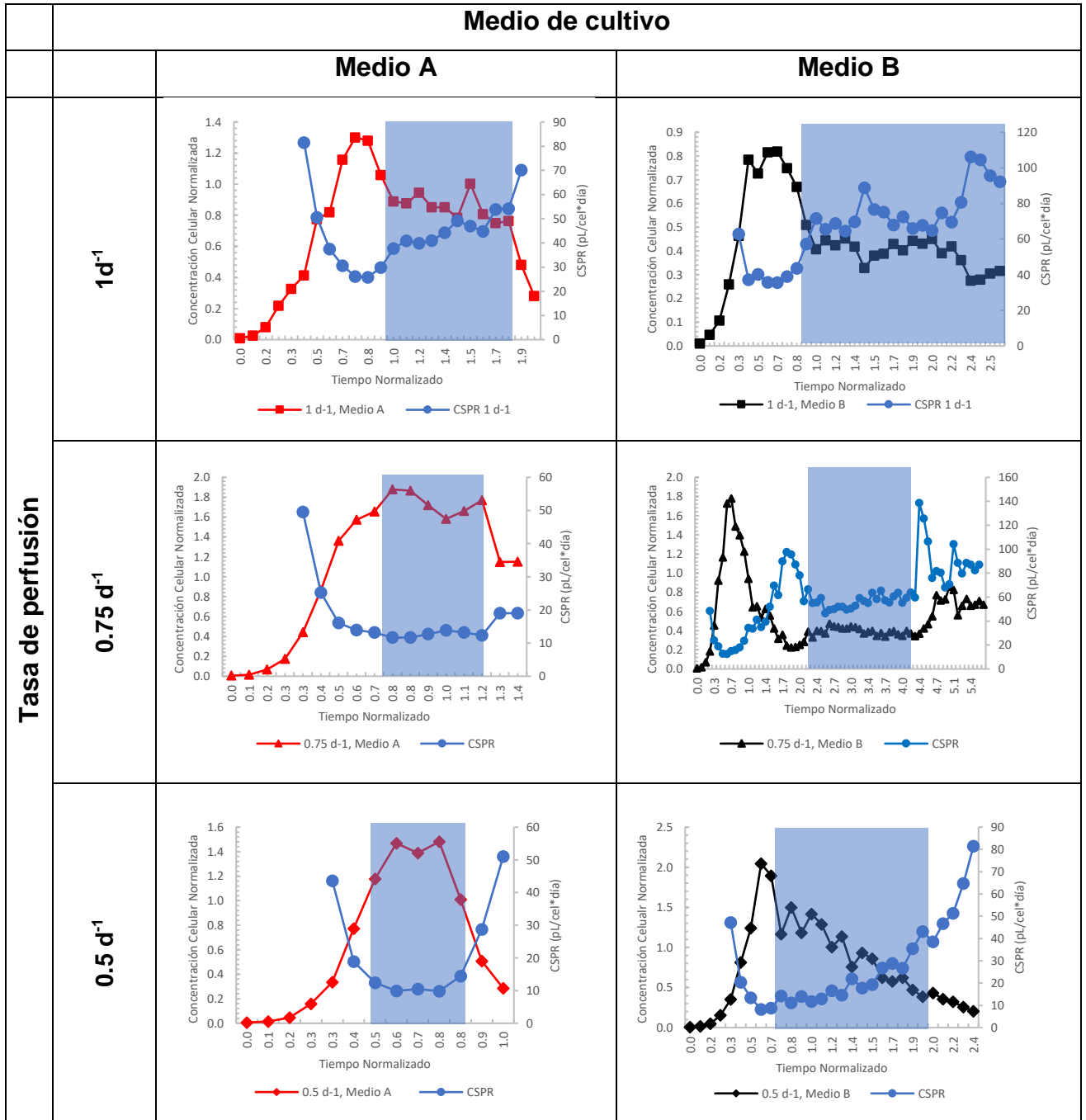


Figura 25 Tasa de perfusión específica y concentración celular para cultivos con medios A, B y C

<i>Cultivo</i>	<i>CSPR promedio en estado estacionario</i>	<i>No. De datos utilizados en el estado estacionario</i>
<b>Medio A, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	43.86± 7	11
<b>Medio B, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	74.70±15	22
<b>Medio C 1.0 d<sup>-1</sup></b>	40.06±18	12
<b>Medio A, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	17.80±1	6
<b>Medio B, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	59.07±15	38
<b>Medio A, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	22.15±2	4
<b>Medio B, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	27.86±10	16

*Tabla 4. Tasa de perfusión específica promedio en el estado estacionario.*

Es evidente que el medio A sostiene valores más bajos de CSPR que el medio B, lo que significa que el primero mantiene una mayor concentración celular con menor cantidad de medio de cultivo, teniendo el valor más bajo para una tasa de 0.75 d<sup>-1</sup>.

El CSPR puede variar ampliamente dependiendo del proceso, línea celular y medio de cultivo, típicamente se encuentra dentro del intervalo de 5 pL/cel-día y 500 pL/cel-día. Wolf et al. (2019) en un sistema de perfusión con células CHO, con un medio químicamente definido en un biorreactor instrumentado de volumen de trabajo de 1.5L y un sistema de retención celular ATF, obtuvieron un CSPR<sub>min</sub> de 33 pL/cel-día. Mencionan que no llevan el CSPR al límite para preservar la estabilidad del cultivo. Para cada medio de cultivo, la operación al CSPR<sub>min</sub> define el mejor punto de operación del cultivo celular ya que garantiza un bajo consumo de medio de cultivo, baja pérdida de producto en el sangrado celular y alta productividad sin comprometer la estabilidad del cultivo ni la calidad del producto (Konstantinov et al., 2006). Para los resultados obtenidos aquí en matraces agitados y con el sistema de perfusión intermitente podríamos definir el CSPR<sub>min</sub> en 44 pL/cel-día para el medio A y 60 pL/cel-día para el medio B, ya que, aunque se obtuvo un CSPR promedio menor con la tasa de 0.5 d<sup>-1</sup>, por debajo de estos valores se ve comprometida la viabilidad celular y por ende también se podría afectar la calidad del producto.

El CSPR no proporciona información directa de la actividad metabólica de las células ni de su viabilidad. El CSPR puede calcularse en cualquier etapa del cultivo, sin embargo, el  $CSPR_{min}$  que se reporta, se calculó en el estado estacionario cuando las células se encuentran en el mismo estado fisiológico y sin tener en cuenta cambios metabólicos que pueden ocurrir en el proceso (Konstantinov et al., 2006). Sin embargo en los datos de la Figura 25 se observa que, aunque se llega a un  $CSPR_{min}$  deseado, la viabilidad de los cultivos realizados con el medio A decae y por lo tanto se suspende el cultivo. Por el otro lado, con el medio B se observa un CSPR desde 27 a ~ 75 pL/cel-día. Al CSPR más bajo (27 pL/cel-día) se puede observar una duración del doble del tiempo de cultivo, con la misma tasa de dilución de  $0.5 d^{-1}$  que con el medio A, lo que nos lleva a concluir que, para este modo de operación, el medio B es mejor que el medio A.

### **8.3 Análisis de producción de anticuerpo monoclonal**

Se determinó la concentración de anticuerpo monoclonal obtenido de cada una de las muestras a lo largo del tiempo como se muestra en la figura 26, en donde los datos se normalizaron con respecto a la concentración máxima obtenida en el cultivo por lote alimentado. En los cultivos por lote alimentado, el producto reside durante todo el cultivo dentro del biorreactor, por lo que se acumula; en contraste, en los cultivos por perfusión el producto es cosechado diariamente y no se acumula. Al contabilizar la cantidad total de AcM producida por los cultivos por perfusión, encontramos que se puede alcanzar hasta 4.3 veces más cantidad de anticuerpo que lo producido en un lote alimentado, además de que el cultivo puede prolongarse hasta por 2.6 veces el tiempo equivalente a un solo lote alimentado, tal y como se muestra en la figura 27.

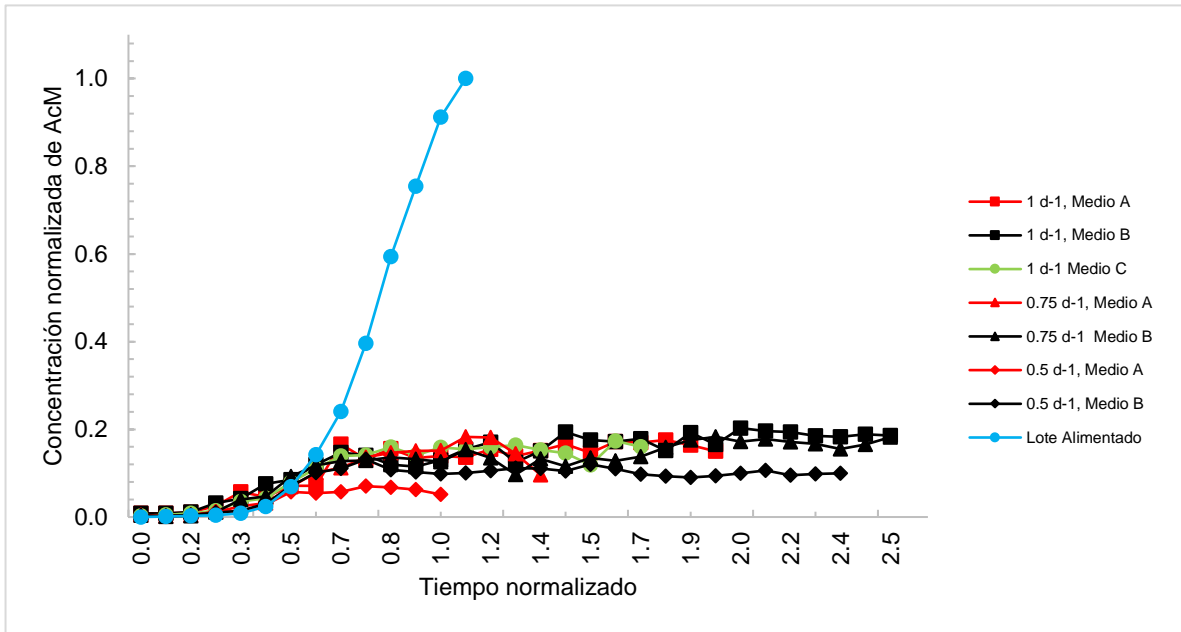


Figura 26 Concentración de anticuerpo monoclonal en lote alimentado y perfusión a distintas tasas.

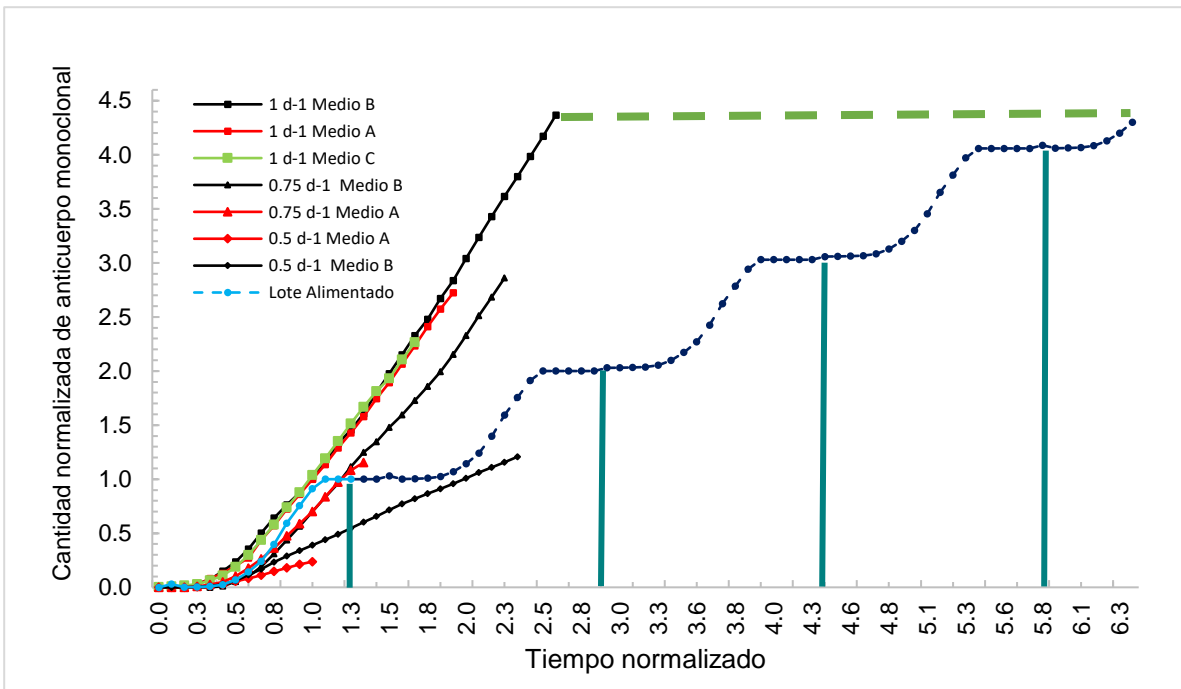


Figura 27 Cantidad total de anticuerpo monoclonal acumulado en el tiempo. La curva azul ilustra el comportamiento esperado si se grafican 5 veces de forma consecutiva los datos de un lote alimentado, la línea continua color azul claro representa el lote alimentado realizado, a partir del cambio de color azul es una simulación, la cual se muestra entre las líneas verticales. La cantidad de AcM está normalizada con respecto al máximo obtenido al final de un cultivo por lote alimentado.

Tabla 5. Valores de cantidad total de anticuerpo monoclonal acumulado en el tiempo.

<i>Cultivo</i>	<i>Cantidad de AcM normalizada</i>	<i>Tiempo normalizado para alcanzar tal cantidad</i>	<i>Rendimiento Global (cantidad de AcM por tiempo de cultivo)</i>
<b>Lote Alimentado</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Medio A, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	2.7	1.9	1.42
<b>Medio B, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	<b>4.3</b>	<b>2.6</b>	<b>1.67</b>
<b>Medio C 1.0 d<sup>-1</sup></b>	2.2	1.7	1.36
<b>Medio A, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	1.2	1.4	1.11
<b>Medio B, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	2.8	2.5	0.86
<b>Medio A, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	0.2	1.0	0.24
<b>Medio B, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	1.2	2.4	0.52

Para que el proceso por lote alimentado pueda llegar a la misma cantidad de anticuerpo monoclonal que el cultivo por perfusión realizado con el medio B a la tasa de perfusión de 1 d<sup>-1</sup> tendrían que realizarse 4.3 lotes alimentados consecutivos como se muestra en la figura 27 y tabla 5, donde cada una de las líneas verticales simula el inicio y fin de un lote alimentado. El tiempo requerido para realizar tales 4.3 lotes alimentados sería 6.4 veces mayor que el necesario para obtener la misma cantidad de anticuerpo en el proceso por perfusión mostrado. La simulación de los lotes alimentados consecutivos incluye 3 días de tren de inóculo necesarios para iniciar un cultivo.

Considerando el tiempo de duración del cultivo, se observa cómo menos de dos lotes alimentados podrían realizarse en el mismo tiempo que un cultivo en perfusión. Así, un solo cultivo por perfusión produciría 2.4 veces más cantidad total de AcM que dos cultivos de lote alimentado consecutivos.

En la tabla 6 se muestran los resultados de productividad volumétrica de AcM obtenidos en los cultivos de lote alimentado y de perfusión intermitente, la cual está calculada de acuerdo con las ecuaciones 6, 7 y 8 de la sección 3.1 y normalizada con respecto a lote alimentado. Los cultivos realizados en modo perfusión

produjeron mayor cantidad de AcM por tiempo de cultivo que aquellos en lote alimentado para todas las tasas de perfusión (excepto para la tasa de  $0.5 \text{ d}^{-1}$  con Medio A). La mayor cantidad de anticuerpo se produjo en la tasa de  $1 \text{ d}^{-1}$  con el medio B donde; alcanzándose una productividad volumétrica de 2.12 veces más que el lote alimentado en 2.6 veces el tiempo de cultivo de un solo lote alimentado.

Tabla 6. Productividad diaria normalizados con respecto a lote alimentado.

<i>Cultivo</i>	<i>Productividad volumétrica diaria normalizada</i>	<i>Tiempo normalizado para alcanzar tal cantidad</i>
<b>Lote Alimentado</b>	1.00	1.0
<b>Medio A, <math>1.0 \text{ d}^{-1}</math></b>	1.84	1.9
<b>Medio B, <math>1.0 \text{ d}^{-1}</math></b>	2.12	<b>2.6</b>
<b>Medio C <math>1.0 \text{ d}^{-1}</math></b>	1.35	1.7
<b>Medio A, <math>0.75 \text{ d}^{-1}</math></b>	1.09	1.4
<b>Medio B, <math>0.75 \text{ d}^{-1}</math></b>	1.72	2.5
<b>Medio A, <math>0.5 \text{ d}^{-1}</math></b>	0.44	1.0
<b>Medio B, <math>0.5 \text{ d}^{-1}</math></b>	1.00	2.4

Los cultivos de células CHO en modo perfusión pueden llegar a producir una mayor cantidad de AcM que los cultivos por lote alimentado, esto debido a múltiples razones, entre ellas se debe a las concentraciones celulares más altas, debido a que la perfusión continua de medio de cultivo proporciona los nutrientes necesarios que permiten llegar a concentraciones celulares más altas que en lote alimentado, lo que aumenta la productividad de producto en el cultivo. Además, el recambio continuo de medio de cultivo resulta en una menor acumulación de productos de desecho, reduciendo el estrés celular y mejorando la eficiencia de producción (Gomez et al., 2019). Lo anterior puede verse reflejado en la velocidad específica de producción de anticuerpo monoclonal ( $q_p$ ) (Tabla 7), que es mayor en cultivos de perfusión que los de lote alimentado. Así mismo, los cultivos realizados con medio B tienen una mayor  $q_p$  que los cultivos en perfusión con el medio A. Sin embargo,

los cultivos por perfusión utilizan alrededor de 20 veces más medio de cultivo que un lote alimentado como lo muestra la tabla 8, por lo tanto, un análisis integral que incluya aspectos económicos tendría que considerar las ventajas de producir más cantidad de anticuerpo monoclonal en una misma instalación contra el mayor gasto de medio de cultivo.

Tabla 7. Velocidad específica de producción de anticuerpo monoclonal ( $q_p$ ) en cultivos por perfusión medio A y medio B y lote alimentado. Valores normalizados con respecto a lote alimentado.

Cultivo	$q_{AcM}$ normalizado
<b>Lote alimentado</b>	1.0
<b>Medio A, 1.0 <math>d^{-1}</math></b>	1.12± 0.08
<b>Medio B, 1.0 <math>d^{-1}</math></b>	2.16± 0.02
<b>Medio C 1-0 <math>d^{-1}</math></b>	1.63±0.05
<b>Medio A, 0.75 <math>d^{-1}</math></b>	0.46± 0.02
<b>Medio B, 0.75 <math>d^{-1}</math></b>	2.09± 0.02
<b>Medio A, 0.5 <math>d^{-1}</math></b>	0.22± 0.01
<b>Medio B, 0.5 <math>d^{-1}</math></b>	0.54± 0.07

Tabla 8. Rendimiento de medio de cultivo por cantidad de AcM producida. Los datos se encuentran normalizados con respecto al lote alimentado.

Cultivo	Rendimiento de medio de cultivo por cantidad de AcM
<b>Lote alimentado</b>	1.0
<b>Medio A, 1.0 <math>d^{-1}</math></b>	6.94
<b>Medio B, 1.0 <math>d^{-1}</math></b>	6.05
<b>Medio C 1-0 <math>d^{-1}</math></b>	7.95
<b>Medio A, 0.75 <math>d^{-1}</math></b>	9.11
<b>Medio B, 0.75 <math>d^{-1}</math></b>	7.57
<b>Medio A, 0.5 <math>d^{-1}</math></b>	21.10
<b>Medio B, 0.5 <math>d^{-1}</math></b>	10.78

En los cultivos por perfusión, al realizar un recambio de medio de cultivo continuo, se utilizan cantidades superiores de medio de cultivo como se muestra en la tabla

8, en comparación con los cultivos realizados en modo lote alimentado, de ahí la necesidad de una operación del cultivo a una baja tasa de perfusión, mientras se mantenga un buen crecimiento celular, viabilidad y productividad específica. No obstante, la mayor cantidad de AcM producido de los cultivos celulares en perfusión puede llevar a una reducción de costos de producción, ya que se produce más cantidad de anticuerpo en menos tiempo y permite un uso más eficiente de los recursos como el número de ciclos (lotes) requeridos para lograr la cantidad de anticuerpo monoclonal deseada.

### 8.3.1 Producción de anticuerpo monoclonal en cultivos en biorreactor

En la figura 28 se muestra la comparación de concentración de AcM producido en matraz y en los dos biorreactores realizados a una tasa de perfusión de  $0.75 \text{ d}^{-1}$ . Los cultivos en biorreactores por perfusión mostraron una comparabilidad alta con respecto a los cultivos realizados en matraz, sin embargo, no se logra un estado estacionario en los cultivos en biorreactor.

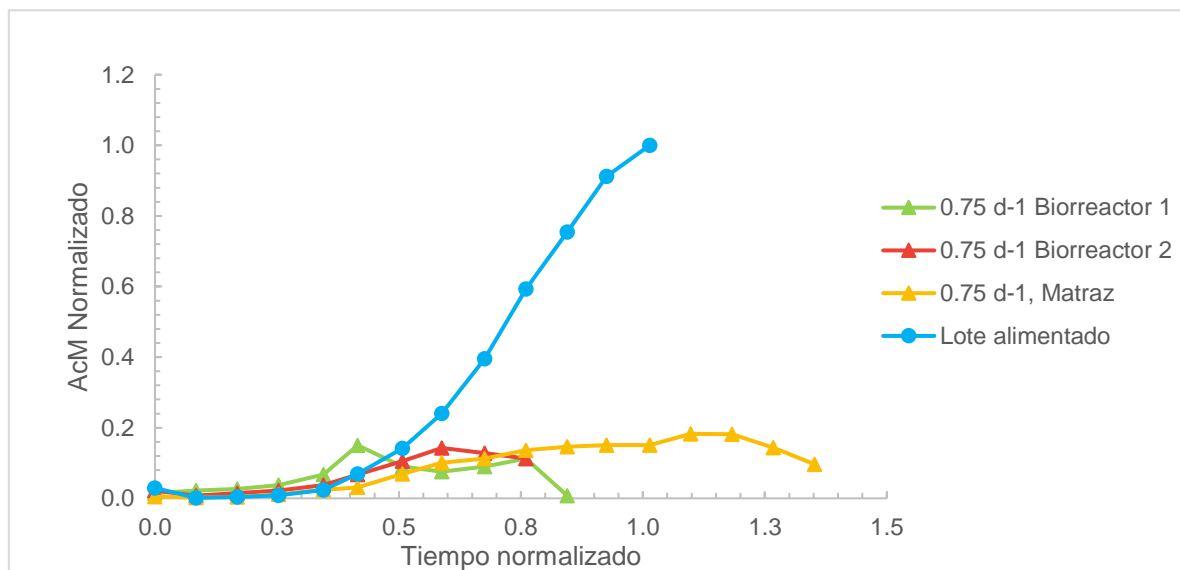


Figura 28 AcM producido en cultivos por perfusión realizados en biorreactor a una tasa de perfusión de  $0.75 \text{ d}^{-1}$  en comparación con el realizado en matraz



## 8.4 Parámetros cinéticos y estequiométricos

Durante los cultivos por perfusión se llevó a cabo un monitoreo de los metabolitos principales, incluyendo las concentraciones de glucosa (Glc), lactato (Lac), glutamina (Gln) y glutamato (Glu), mediante mediciones previas y posteriores al proceso de centrifugación (Figuras 29, 30 y 31). Las concentraciones de metabolitos se encuentran normalizadas respecto a los valores máximos del lote alimentado. Se observan patrones en forma de zigzag en las gráficas correspondientes debido a la dinámica de consumo y reabasto de estos metabolitos durante el proceso de perfusión intermitente. En particular, en el caso de las concentraciones de glucosa y la glutamina, se registró un consumo prácticamente total, seguido de una restitución de la concentración de estos metabolitos con el recambio de medio fresco.

Para simplificar el análisis de los resultados, se muestra en las Figuras 32, 33 y 34 solamente las concentraciones diarias de estos metabolitos, es decir, antes del recambio diario de medio de cultivo a sus respectivas tasas. Se observa que en algunas fases del cultivo con medio A la glucosa se consumió totalmente en todas las tasas debido a una menor concentración de glucosa en este medio. Lo mismo sucede para el medio B a la tasa de perfusión más baja ( $0.5 \text{ d}^{-1}$ ), lo cual se debe a un abasto menor de nutrientes bajo estas condiciones.

Para la determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos se calcularon los consumos de metabolitos, como glucosa y glutamina, y la producción de otros, como glutamato y lactato, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$q_m = \frac{(S_i - S_{i+1})}{\bar{X}_v (t_i - t_{i+1})} \dots \dots \dots (12)$$

donde  $q_m$  es la velocidad específica de consumo o producción del metabolito  $m$ ,  $t$  es tiempo,  $S_i$  y  $S_{i+1}$  son las concentraciones del metabolito en el tiempo "i" e "i+1", respectivamente,  $\bar{X}_v$  es la concentración de células promedio entre el tiempo "i" e "i+1". Valores positivos corresponderán a metabolitos que se producen y los

negativos a aquellos que se consumen. Los rendimientos del metabolito m1 con respecto al metabolito m2 se calcularon con la siguiente ecuación:

$$Y_{\frac{m_1}{m_2}} = \frac{[m_{1\ i+1} - m_{1\ i}]}{[m_{2\ i+1} - m_{2\ i}]} \dots\dots\dots (13)$$

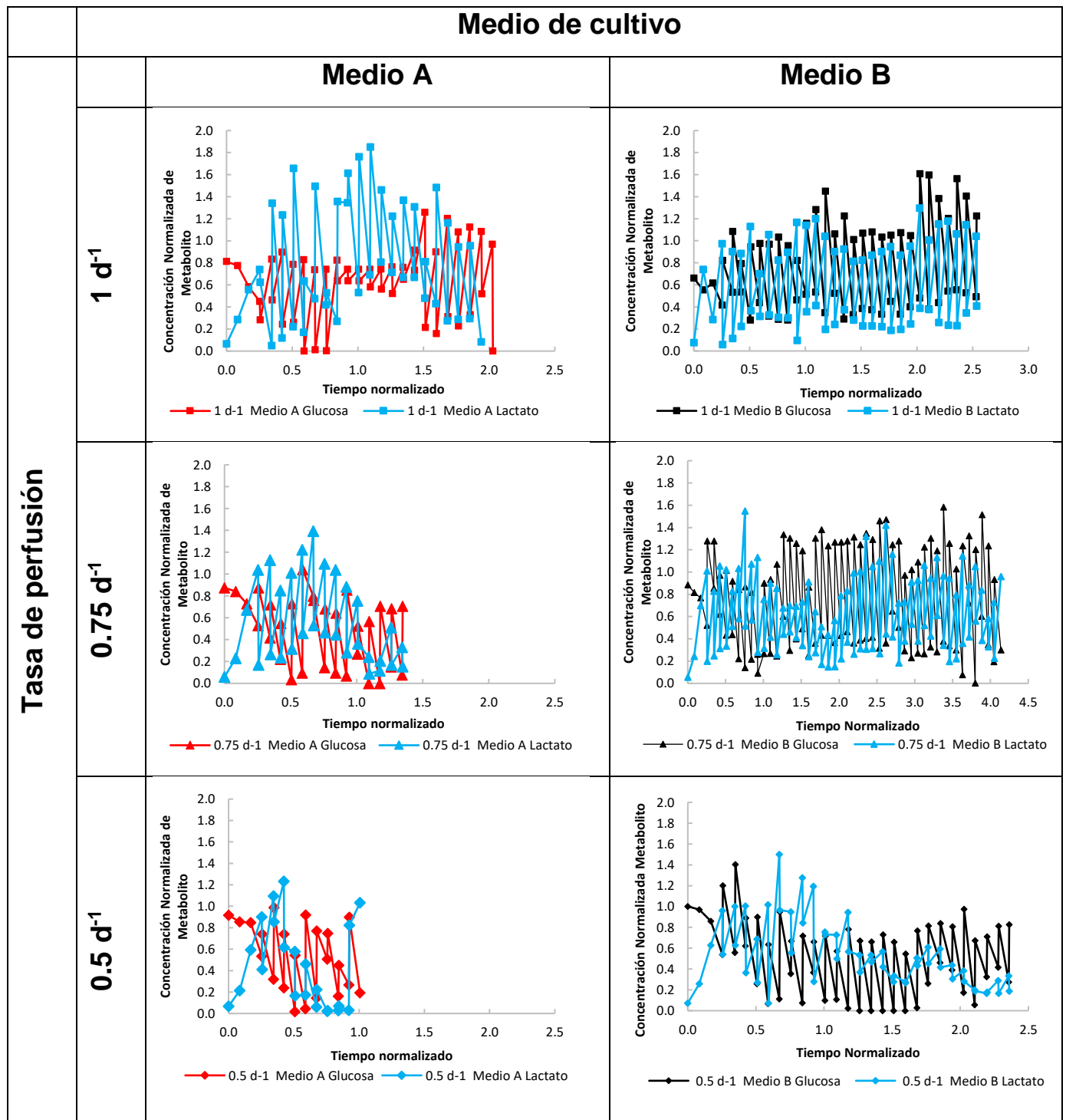


Figura 29 Gráficas de concentración normalizada de glucosa y lactato para tasa de perfusión de 1, 0.75 y 0.5 d<sup>-1</sup> con datos antes y después del proceso de perfusión intermitente

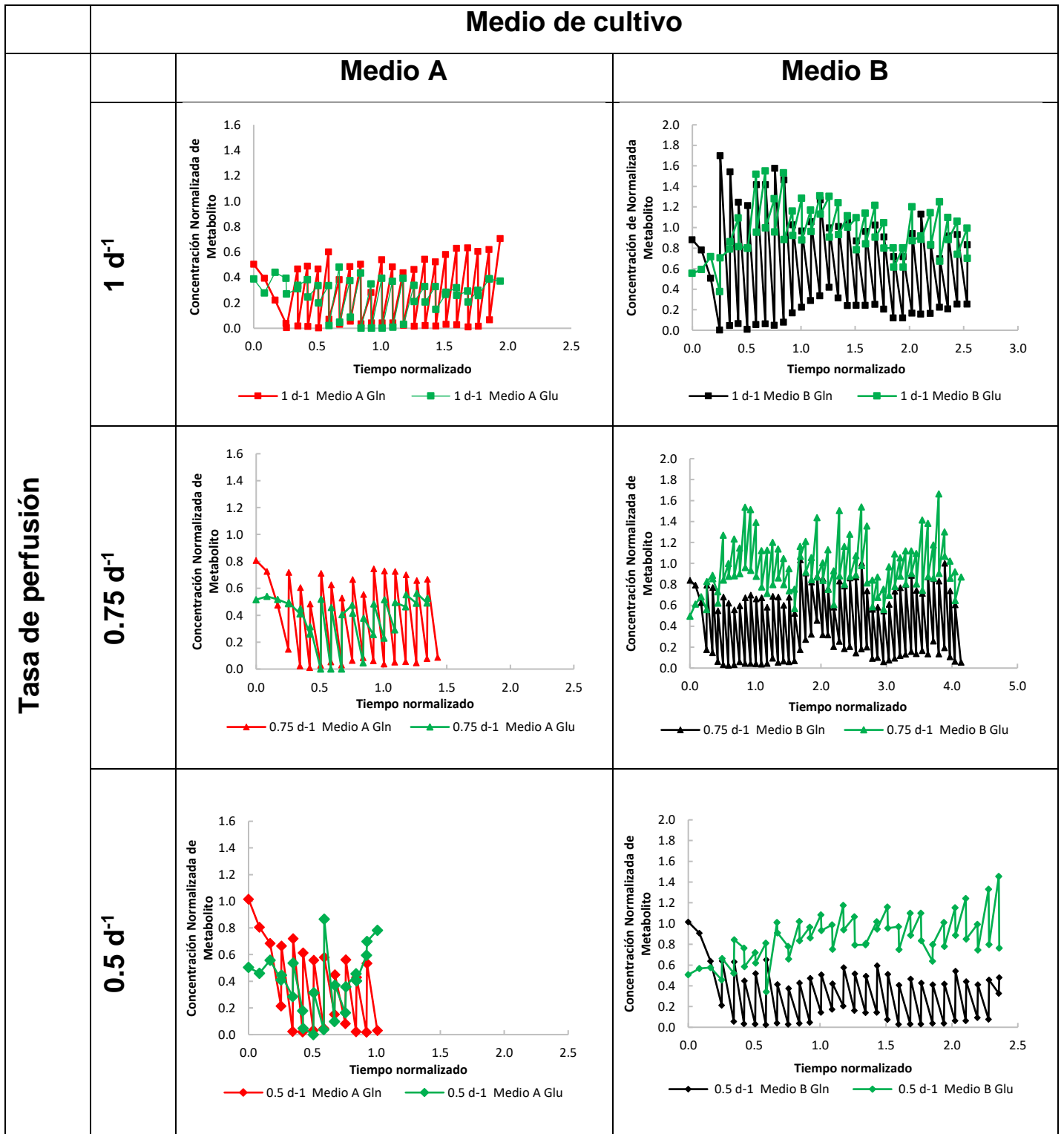


Figura 30 Gráficas de concentración normalizada de glutamina y glutamato para tasas de perfusión de 1, 0.75 y 0.5 d<sup>-1</sup>, con datos antes y después del proceso de perfusión intermitente

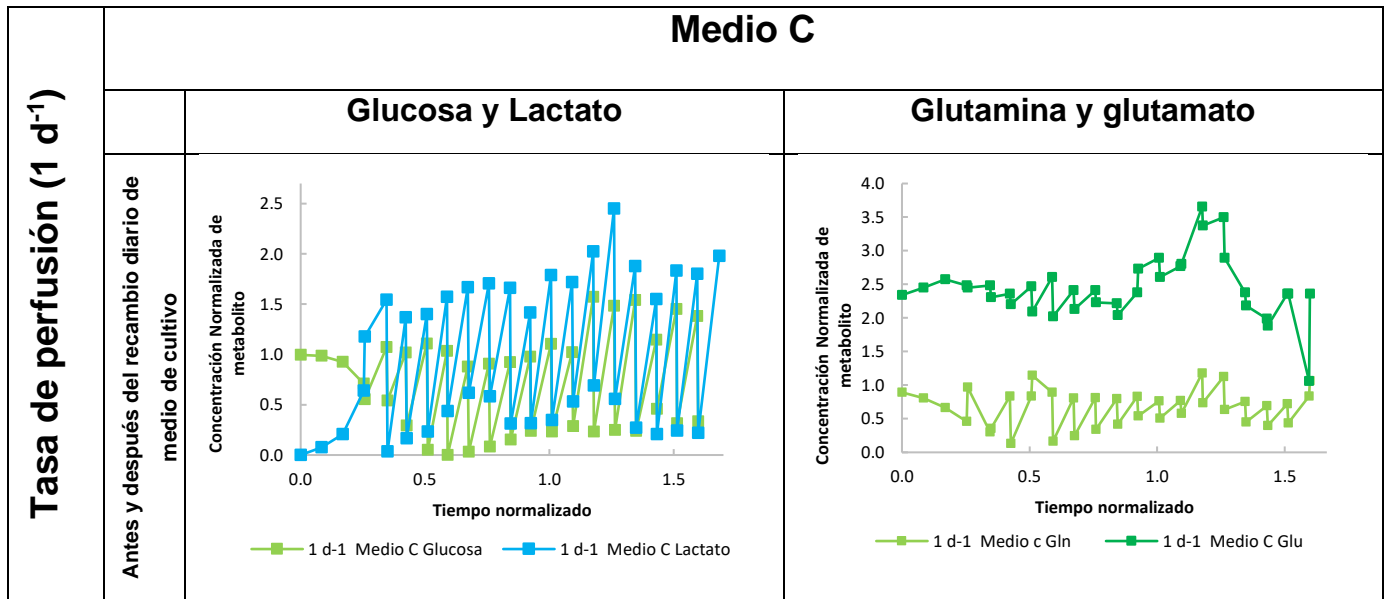


Figura 31. Gráficas de concentración normalizada de Glc, Lac, Gln y Glu para tasa de perfusión de 1 d<sup>-1</sup>, con el medio C con datos antes y después del proceso de perfusión intermitente

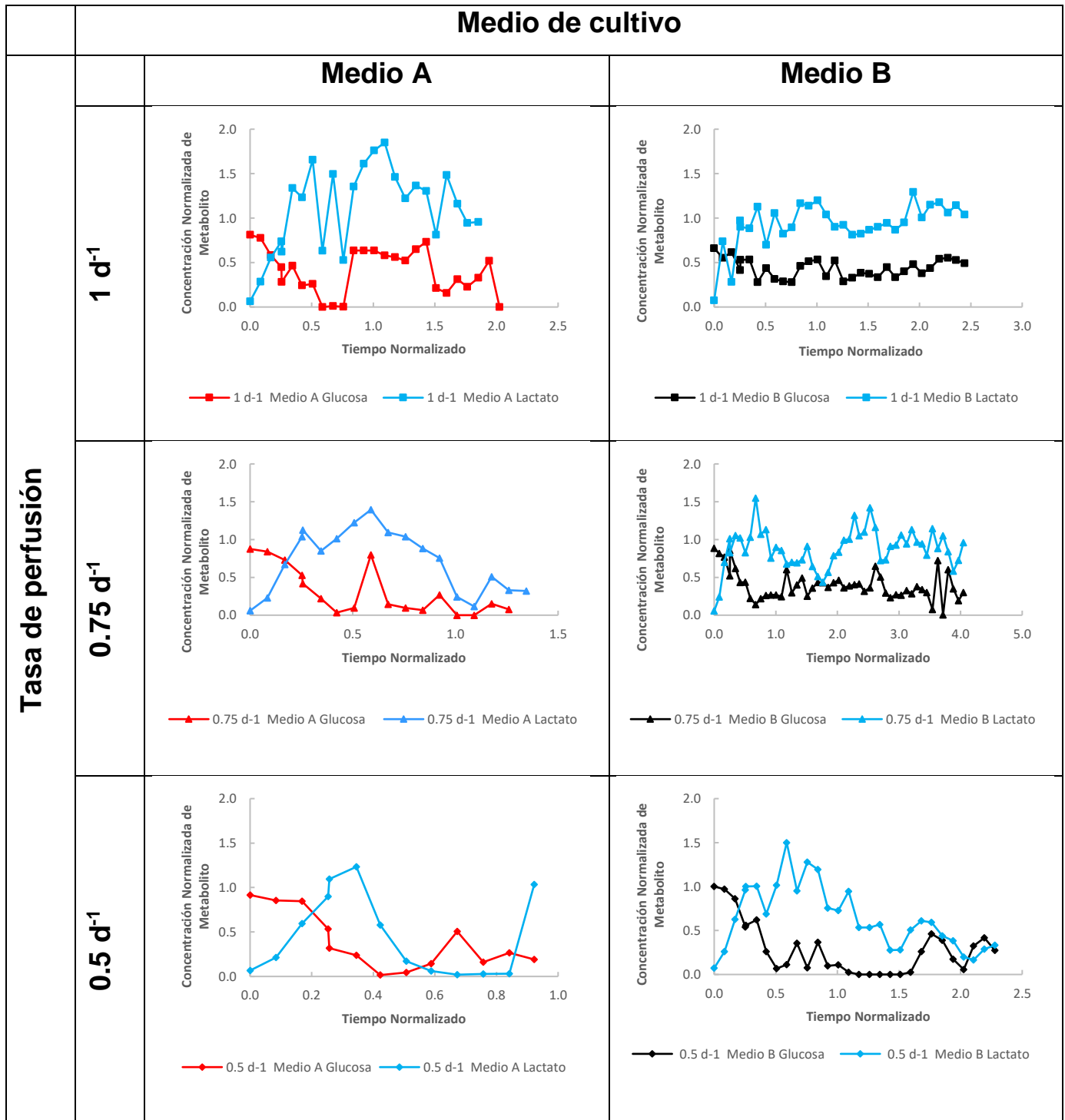


Figura 32 Gráficas de concentración normalizada de glucosa y lactato, antes del recambio diario de medio de cultivo para tasa de perfusión de 1, 0.75 y 0.5 d<sup>-1</sup>. La concentración de los metabolitos fue normalizada con respecto a los valores máximos del lote alimentado.

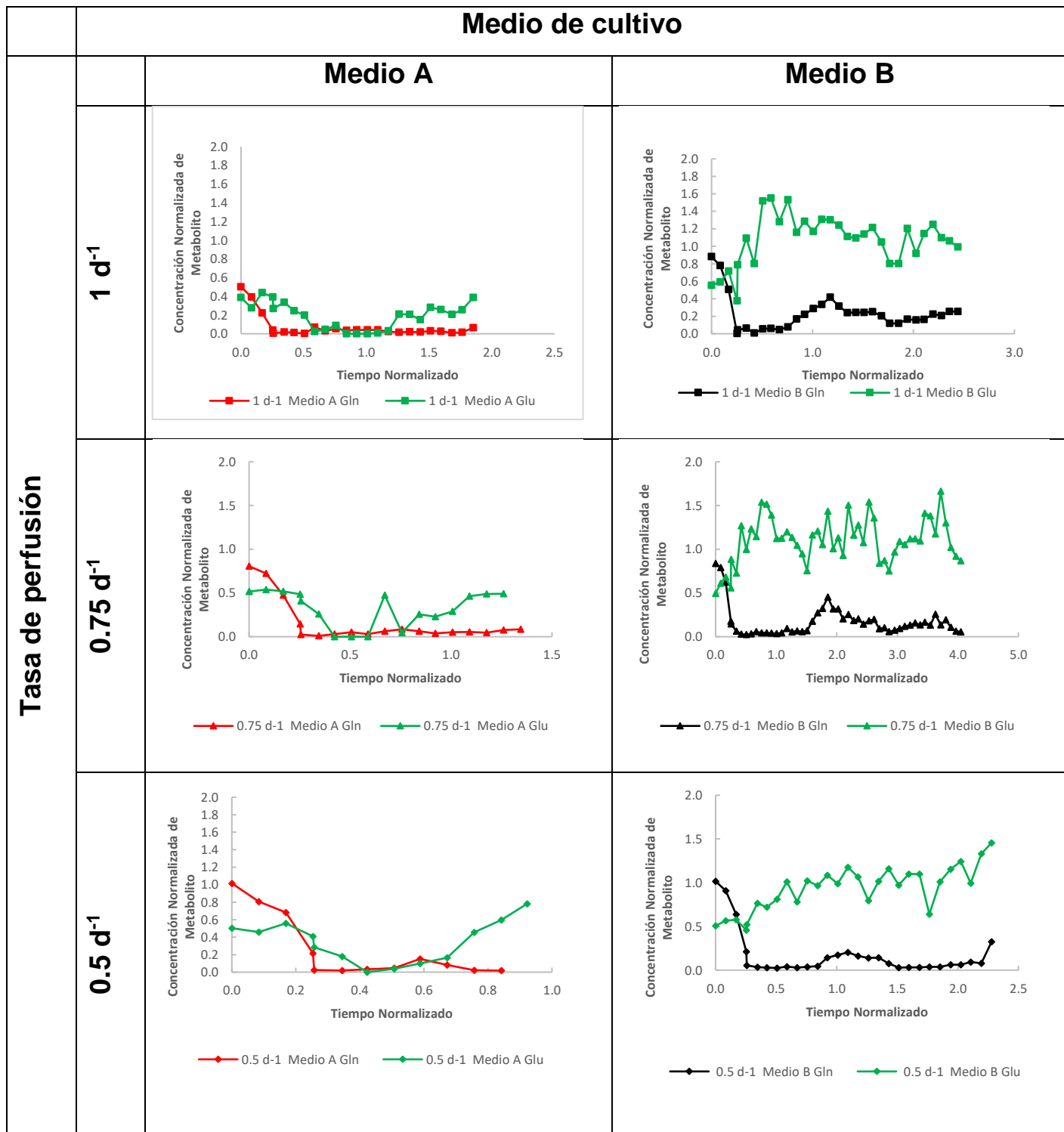


Figura 33 Gráficas de concentración normalizada de glutamina y glutamato, antes del recambio diario de medio de cultivo, para tasa de perfusión de 1, 0.75 y 0.5 d<sup>-1</sup>. La concentración de los metabolitos fue normalizada con respecto a los valores máximos del lote alimentado.

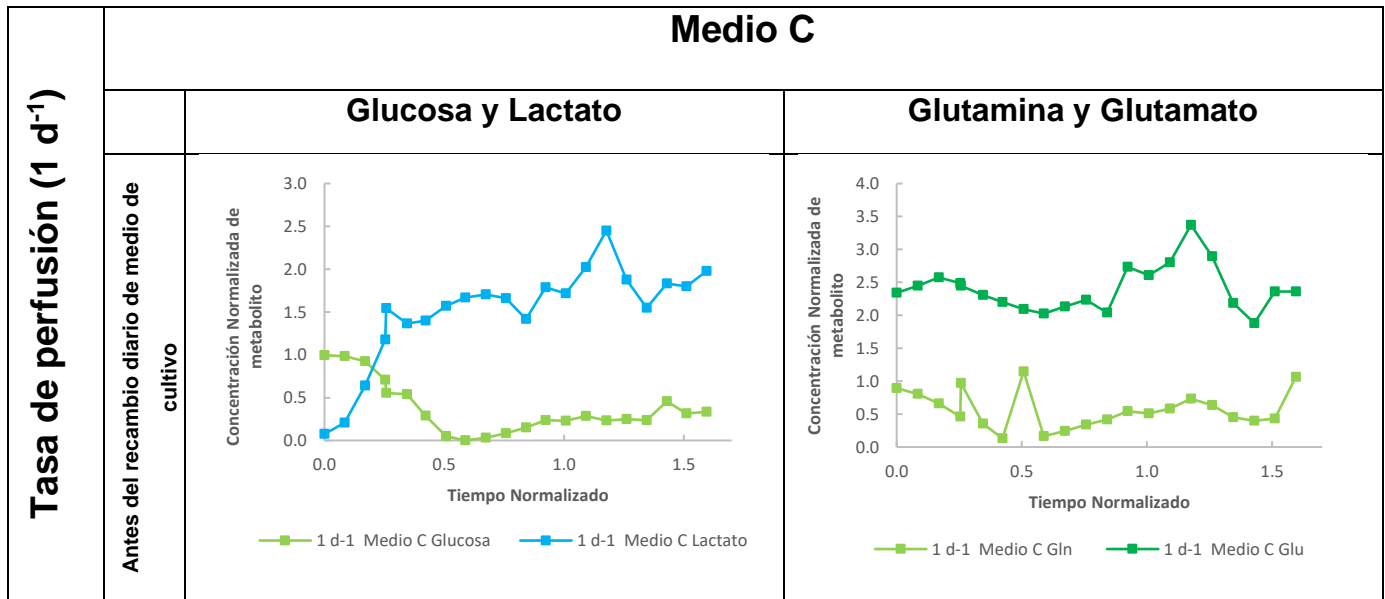


Figura 34. Gráficas de concentración normalizada de Glc, Lac, Gln y Glu para tasa de perfusión de 1 d-1, con el Medio C con datos antes del proceso de perfusión intermitente. La Concentración de los metabolitos fue normalizada con respecto a los valores máximos del lote alimentado

Los cultivos de células de mamífero en modo perfusión que se han reportado en la literatura suelen iniciarse como cultivos por lotes para primeramente expandir la concentración celular. Durante este proceso, las células metabolizan a lactato la mayor parte de la glucosa consumida y consumen un exceso de glutamina y otros aminoácidos, mientras secretan amonio y algunos aminoácidos no esenciales como alanina (Europa et al. 2000). Sin embargo, al comenzar la perfusión o el modo continuo, se observa en las gráficas que tanto la concentración celular, como las concentraciones de lactato continúan aumentando ligeramente antes de estabilizarse en el estado estacionario. Los cultivos en estado estacionario metabolizan glucosa principalmente mediante su oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, lo que proporciona un rendimiento mucho más alto de ATP y reduce la acumulación de subproductos en comparación con cultivos tradicionales de lote alimentado. También una mayor proporción de glucosa consumida se desvía hacia la vía de pentosa fosfato oxidativa para mantener los niveles de NADPH (Young, 2013).

En la Tabla 9 y Figura 35 se muestran los rendimientos celulares, de lactato y de anticuerpo monoclonal con respecto al consumo de glucosa. También se muestra



el rendimiento de anticuerpo por célula. Estos parámetros fueron obtenidos con las lecturas en el estado estacionario para cada cultivo en perfusión intermitente. Estos parámetros fueron normalizados con respecto a los valores respectivos obtenidos en los cultivos de lote alimentado.

Tabla 9. Rendimientos en el estado estacionario normalizados con respecto a lote alimentado. Los valores de  $\pm$  indican las desviaciones estándar de cada rendimiento en el estado estacionario

	$Y_{X/Glc}$	$Y_{Lac/Glc}$	$Y_{AcM/Glc}$	$Y_{AcM/X}$
<b>Lote Alimentado</b>	1	1	1	1
<b>Medio A, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	0.40± 0.03	0.25± 0.02	0.58± 0.06	1.32± 0.14
<b>Medio B, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	0.25± 0.05	0.21± 0.02	0.49± 0.01	2.10± 0.04
<b>Medio C, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	0.21±0.06	0.36±0.05	0.39±0.02	1.88±0.07
<b>Medio A, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	1.46± 0.04	0.12± 0.02	0.59± 0.06	0.6± 0.04
<b>Medio B, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	0.21± 0.02	0.16± 0.01	0.50± 0.11	2.42± 0.04
<b>Medio A, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	0.97± 0.19	0.04± 0.01	0.67± 0.14	0.30± 0.05
<b>Medio B, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	0.72± 0.05	0.06± 0.05	0.37± 0.06	0.64± 0.13

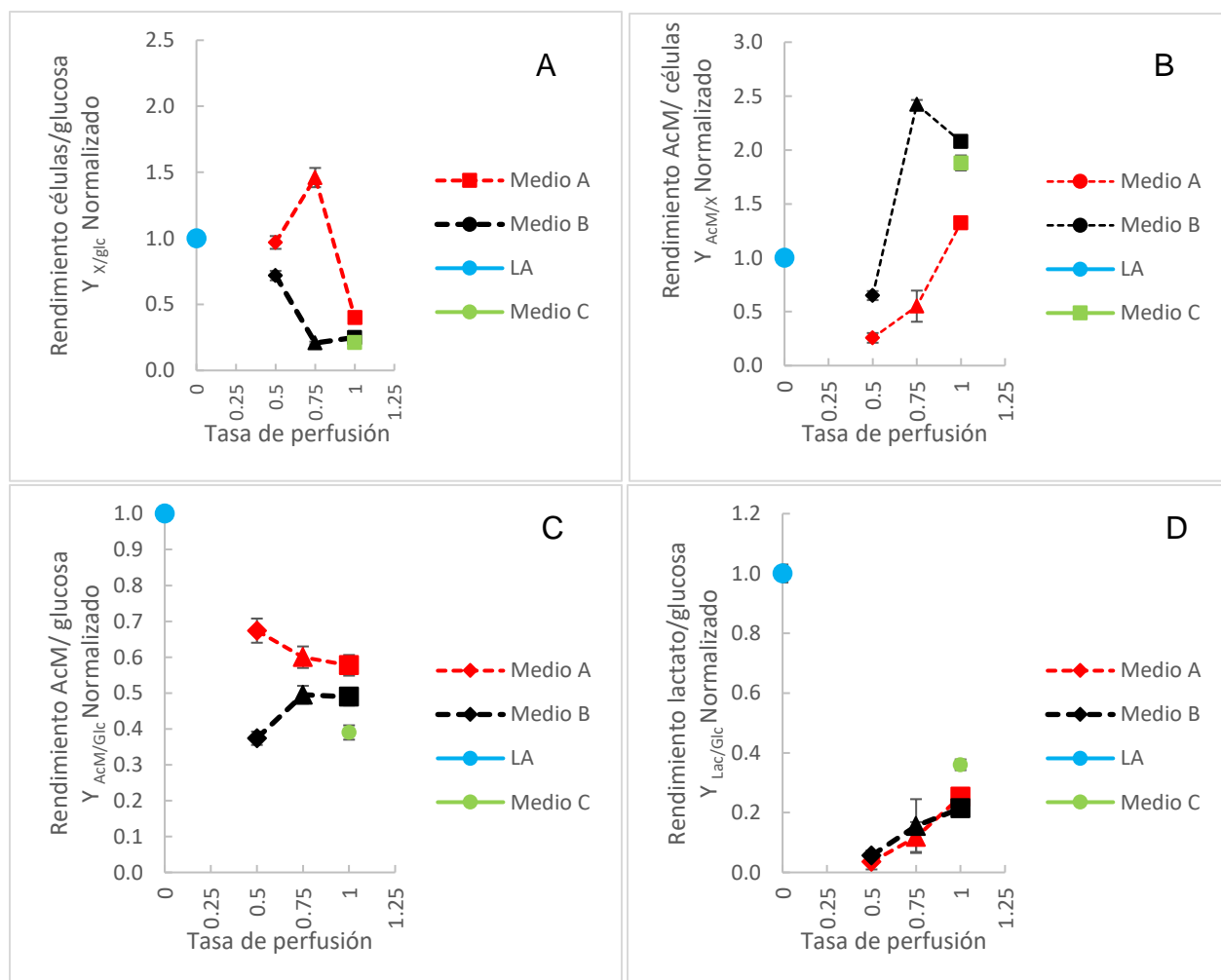


Figura 35 A) Rendimiento de células con respecto a glucosa consumida, (B) anticuerpo monoclonal con respecto a células viables, (C) anticuerpo monoclonal con respecto a glucosa consumida y (D) lactato con respecto a glucosa consumida. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándares de los datos en el estado estacionario.

Como se muestra en la figura 35 y tabla 9 los cultivos realizados con el medio de cultivo A presentaron un mayor rendimiento de células con respecto al consumo de glucosa en tasa de perfusión de 0.75 y 0.5 d<sup>-1</sup> pero presentaron un menor rendimiento de producción de anticuerpo monoclonal con respecto a células viables, tal y como se muestra también en la figura 36. Por otro lado, aunque se obtuvo lo contrario en los cultivos con el medio B, estos duplicaron el rendimiento de anticuerpo con respecto a las células viables (figura 35, B). El espacio de diseño ideal sería el marcado con un recuadro amarillo en la figura 36, en donde el rendimiento de concentración celular con respecto al consumo de glucosa sea bajo, mientras que el rendimiento de AcM con respecto a esa concentración celular sea alto. Lo anterior, ya que en la fase estacionaria el aprovechamiento de la glucosa se divide para energía de mantenimiento y producción de proteínas recombinantes en lugar de aumentar la concentración celular, es por eso que, al alcanzar la concentración celular deseada se inician los sangrados celulares para mantener una concentración celular estable en el llamado estado estacionario.

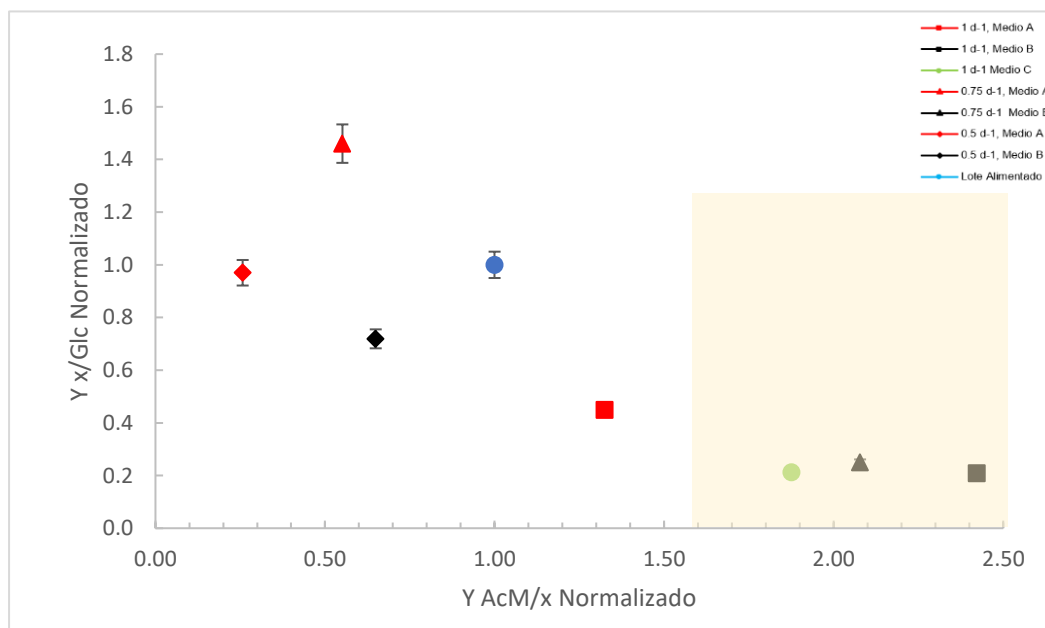


Figura 36. Relación entre rendimiento de células con respecto a glucosa y AcM con respecto a células. La normalización de los datos se realiza con respecto a lote alimentado en todos los casos.

En la Tabla 10 y figuras 37 y 38 se muestran las velocidades específicas de producción de metabolitos (glucosa, lactato, glutamina y glutamato) en la fase estacionaria además de la velocidad de producción de anticuerpo monoclonal. Estas velocidades se encuentran normalizadas con respecto a los cultivos de lote alimentado.

Tabla 10. Velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos y anticuerpo monoclonal. Los valores de +/- representan las desviaciones estándar de cada velocidad en el estado estacionario. Los valores se encuentran normalizados con respecto a lote alimentado.

	$q_{Glc}$	$q_{Gln}$	$q_{Glu}$	$q_{Lac}$	$q_{AcM}$
<b>Lote alimentado</b>	1	1	1	1	1
<b>Medio A, 1 d<sup>-1</sup></b>	2.04± 0.23	0.43± 0.05	0.12± 0.06	0.24± 0.02	1.17± 0.08
<b>Medio B, 1 d<sup>-1</sup></b>	3.79± 0.06	1.08± 0.07	0.16± 0.08	0.37± 0.02	2.26± 0.03
<b>Medio C, 1 d<sup>-1</sup></b>	4.35±0.06	0.29±0.04	0.12±0.07	0.72±0.09	1.71±0.04
<b>Medio A, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	0.82± 0.02	0.19± 0.01	0.06± 0.02	0.03± 0.02	0.48± 0.02
<b>Medio B, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	3.68± 0.61	0.92± 0.06	0.13± 0.13	0.31± 0.11	2.19± 0.04
<b>Medio A, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	0.58± 0.14	0.19± 0.01	0.04± 0.01	0.35± 0.12	0.23± 0.01
<b>Medio B, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	1.21± 0.03	0.25± 0.04	0.09± 0.05	0.03± 0.01	0.56± 0.07

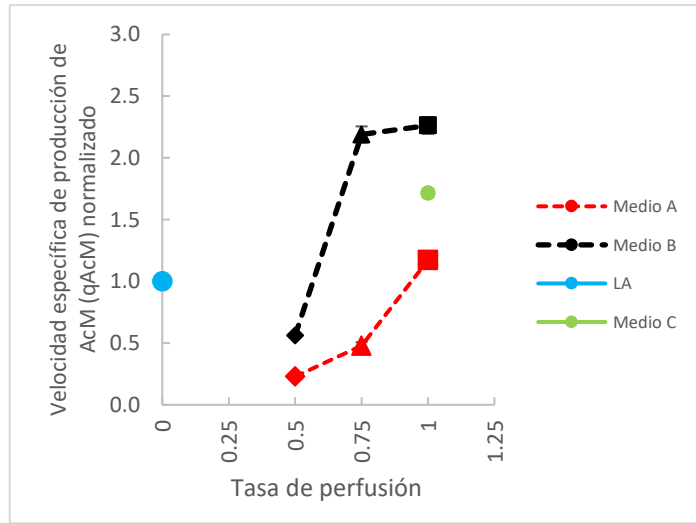
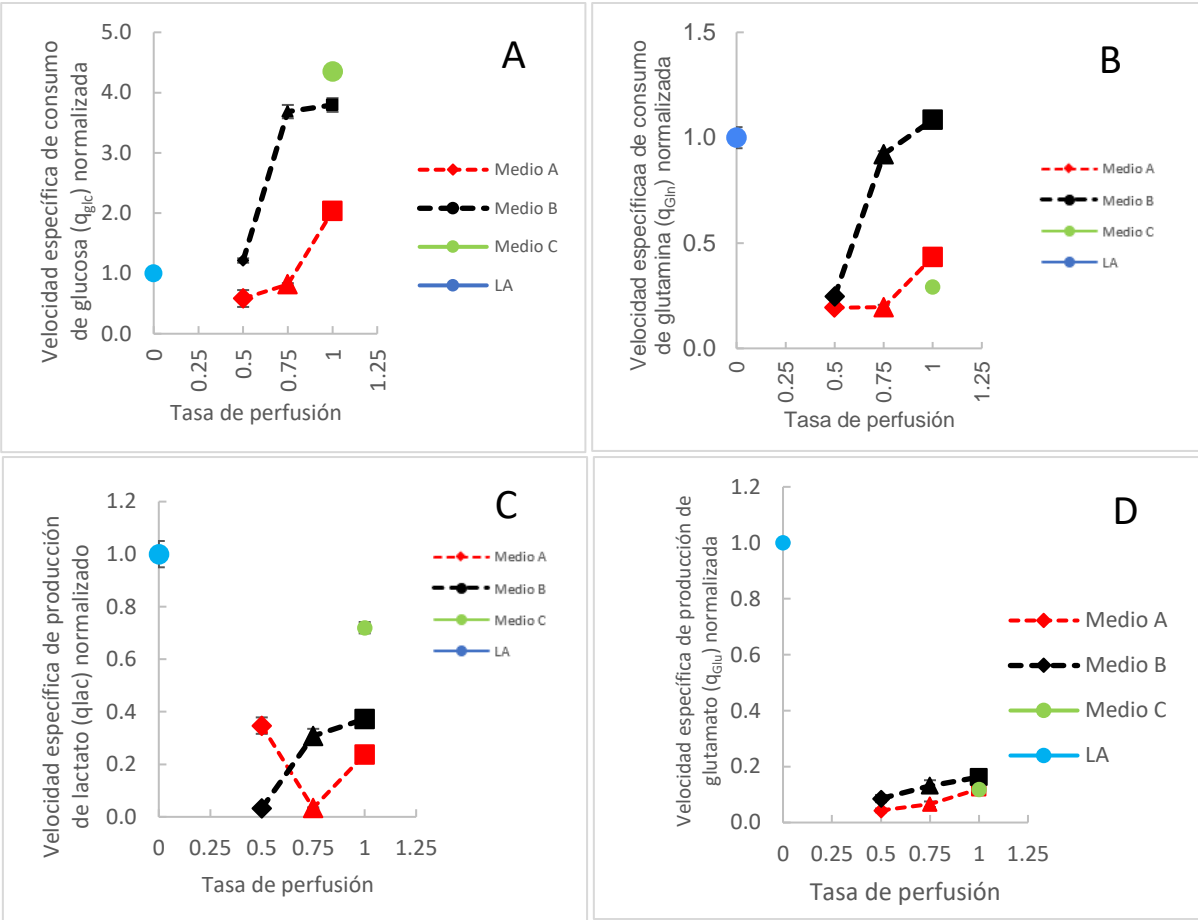


Figura 38 Velocidad específica de producción de AcM normalizado con respecto a lote alimentado. Las barras de error no se alcanzan a distinguir debido a que sus valores son muy pequeños.

Los cultivos realizados con medio B tuvieron mayores velocidades de consumo de glucosa y glutamina que los cultivos con medio A, lo cual se ve reflejado también en general a una mayor producción de lactato y glutamato. Se observa también un aumento en el consumo de ambos nutrientes conforme la tasa de perfusión aumenta, debido al mayor abasto de este metabolito, lo que muestra como la tasa de perfusión determina la velocidad de consumo de la fuente de carbono y nitrógeno. Los cultivos con altas concentraciones de metabolitos, es decir, los cultivos con medio B tuvieron un consumo de glucosa de 1 a 3 veces mayor que los cultivos con una concentración más baja de glucosa. Igualmente, tuvieron mayor velocidad de producción de lactato, excepto en la tasa de perfusión de  $0.5 \text{ d}^{-1}$ . De hecho, cuanto mayor es la concentración de glucosa, mayor es la tasa de consumo de glucosa y producción de lactato, incluso cuando se suministra oxígeno suficiente para soportar el crecimiento exponencial de las células. Este fenómeno que ocurrió en nuestros cultivos es conocido como efecto Warbug (Young, 2013) y se exagera debido al diseño del experimento de perfusión intermitente en donde la renovación del medio de cultivo no fue continua, sino que se ajustó diariamente, por lo que los cultivos se comportaron como “lotes cortos” de 24 horas y estuvieron expuestos a altas concentraciones de glucosa y lactato. Se sabe que puede ocurrir un cambio en el metabolismo en cierto punto, dependiendo de la composición del medio de cultivo y de la clona, que pasa del empleo de la principal vía glucolítica que produce lactato a partir de glucosa a una vía más oxidativa que vuelve a consumir el lactato a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Maria et al. 2023).

En el caso de la velocidad específica de producción de anticuerpo monoclonal, se observa que los cultivos con el medio B presentan velocidades mayores que los cultivos hechos con medio A, además de que las velocidades son mayores conforme aumenta la tasa de perfusión. Sin embargo, no se distingue una diferencia significativa entre la velocidad de producción de anticuerpo en los cultivos con medio B con tasa de perfusión de 1 y  $0.75 \text{ d}^{-1}$ , que fueron las condiciones en las que la velocidad fue la máxima.

## 8.5 Calidad del anticuerpo monoclonal

Aunque existen muchos atributos críticos que determinan la calidad de un AcM, en este trabajo se midieron solamente dos características como indicativos de calidad: variantes de carga y el perfil de N-glicosilación. Para el análisis de calidad, el anticuerpo monoclonal de los cultivos de lote alimentado se purificó de acuerdo con la sección 7.5. En cuanto a los cultivos de perfusión intermitente se colectaron de forma arbitraria cosechas obtenidas de los recambios de medio de cultivo como se muestra en la figura 39, a estas muestras acumuladas se les denominó “partida”. De cada partida se purificó 100mL a través de la misma metodología descrita en la sección 7.5.

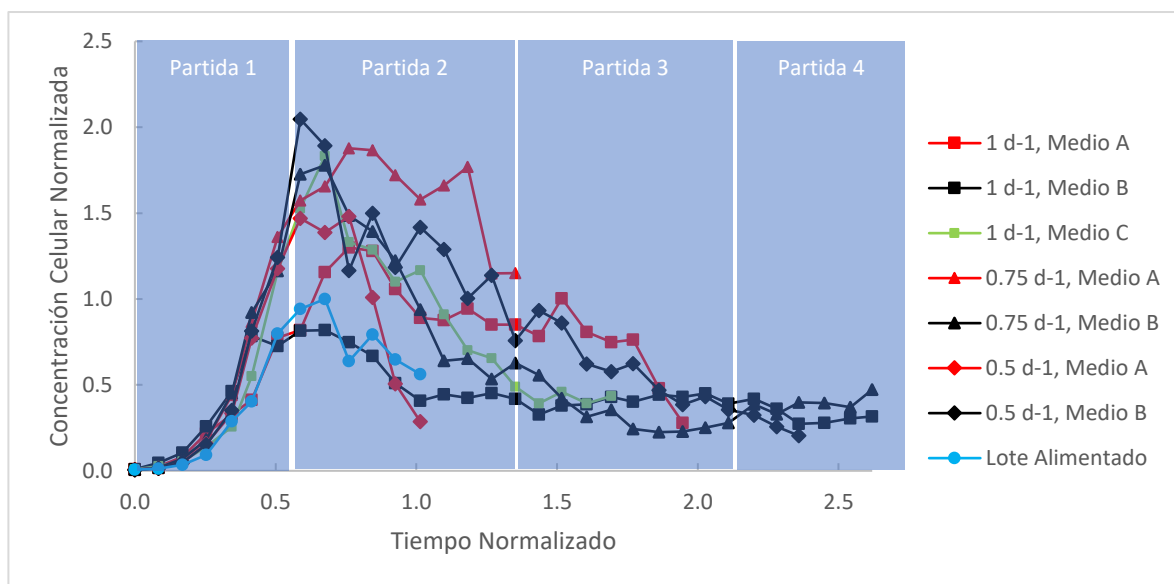


Figura 39 Colectas de cosechas (partidas) realizadas para pruebas de calidad del anticuerpo monoclonal.

### 8.5.1 Variantes de carga

Se realizó el análisis de la distribución de isoformas para cada una de las partidas de cada cultivo de acuerdo con la metodología descrita en el punto 5.5.2. En la Figura 40 se muestra un cromatograma típico de una cromatografía de intercambio iónico que se compone de 3 picos, los primeros de izquierda a derecha corresponden a variantes ácidas, que son las que al tener carga más negativa presentan menores tiempos de retención. El pico del centro es el pico principal, que

se encuentra en una retención intermedia entre las variantes y los picos de la derecha son isoformas básicas que al tener carga más positiva presentan un mayor tiempo de retención (Du et al., 2012). En este cromatograma se puede observar la diferencia de variantes de carga en cultivos en modo lote alimentado en color azul y en modo perfusión en color rojo, así como su intersección en color morado. Es evidente que en modo perfusión (rojo) existen menos variantes de carga tanto ácidas como básicas. Se ha demostrado que las variantes de carga pueden influir significativamente en las propiedades *in vivo* de los anticuerpos, puesto que pueden cambiar la unión a proteínas o membranas celulares, lo que afecta la penetración y distribución en los tejidos y la farmacocinética de los anticuerpos (Torkashvand and Vaziri 2017). Por lo tanto, de acuerdo con el cromatograma de la figura 40, es claro que los cultivos en perfusión resultan en una mayor calidad del producto al tener mayor cantidad de pico principal deseado que de variantes de carga.

Los impactos de las variantes de carga dependen en gran medida de la naturaleza, el sitio y cantidad de modificaciones postraduccionales que provocan. Las variantes ácidas en los anticuerpos generalmente se forman por desaminación de residuos de asparagina (Asn), niveles más altos de ácido siálico, enlaces disulfuros no convencionales o glicación (Ha et al., 2021). Por el contrario, las especies básicas se forman principalmente por la eliminación incompleta de la lisina C-terminal, también pueden formarse por la ciclación incompleta de la glutamina N-terminal a piroglutamato y la oxidación de los residuos de metionina (Khawli et al., 2010).

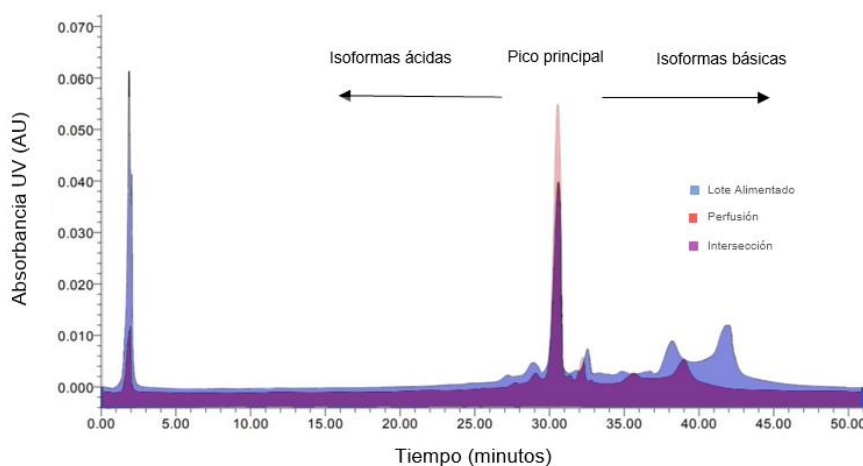


Figura 40 Cromatografía de intercambio catiónico para la determinación de variantes de carga del anticuerpo monoclonal producido por lote alimentado (azul) y perfusión (rojo).

En la Figura 41 y en la tabla 11 se presenta la distribución de las variantes de carga promedio de todas las partidas de cada uno de los cultivos realizados con sus diferentes tasas de perfusión, los valores se encuentran normalizados con respecto al cultivo de lote alimentado. En promedio se presentan 48% menos de variantes ácidas en los cultivos de perfusión con respecto a los cultivos de lote alimentado y 49% menos variantes básicas con respecto a los cultivos de lote alimentado. En cuanto al pico principal, los cultivos por perfusión presentan en promedio un pico principal 30% mayor que en los cultivos por lote alimentado.

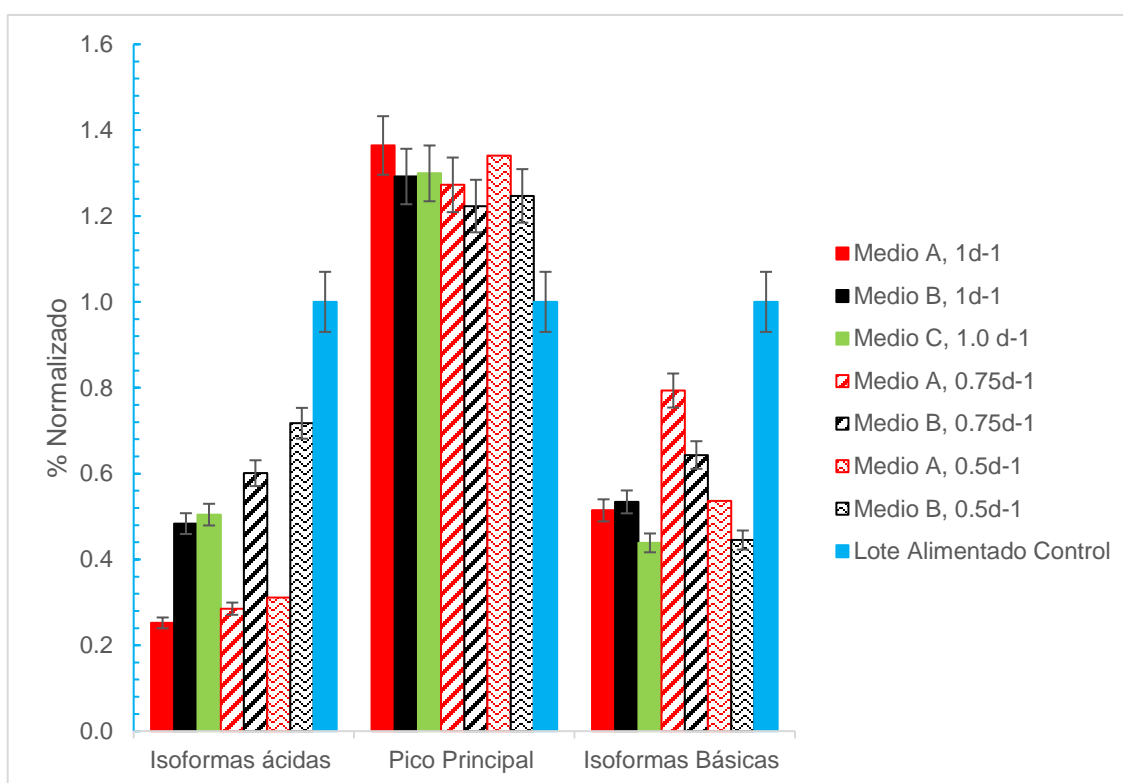


Figura 41 Distribución de variantes de carga normalizadas con respecto a lote alimentado. Las barras de error indican la desviación estándar entre partidas

<i>Cultivo</i>	<i>Ácidas</i> <i>Promedio (%)</i>	<i>Principal</i> <i>Promedio (%)</i>	<i>Básicas</i> <i>Promedio (%)</i>
<b>Lote Alimentado</b>	1±0.05	1±0.05	1±0.05
<b>Medio A, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	0.25±0.01	1.36±0.07	0.51±0.03
<b>Medio A, 0.75 d<sup>-1</sup></b>	0.29±0.01	1.27±0.06	0.79±0.04



<b>Medio A, 0.5 d<sup>-1</sup></b>	0.31	1.34	0.53
<b>Medio B, 1.0 d<sup>-1</sup></b>	0.49±0.02	1.28±0.06	0.54±0.03
<b>Medio B 0.75 d<sup>-1</sup></b>	0.60±0.03	1.22±0.06	0.64±0.03
<b>Medio B 0.5 d<sup>-1</sup></b>	0.72±0.02	1.24±0.07	0.44±0.03
<b>Medio C 1.0d<sup>-1</sup></b>	0.50±0.03	1.30±0.06	0.44±0.02

Tabla 11. Distribución de variante de cargas normalizadas con respecto a valores del lote alimentado.

En la figura 42 se muestra el cambio de las variantes de carga durante el tiempo de cultivo, el recuadro azul claro representa su especificación de acuerdo con los criterios de calidad establecidos para este producto. No se observa un cambio en cuanto a la variación de isoformas entre partidas, es decir que no existe un cambio a lo largo del tiempo de cultivo.

En un trabajo realizado por Walther et al. (2019) una línea de células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal IgG1 generaron 20% más especies neutras en cultivos por perfusión que en cultivos por lote alimentado. En ese estudio se monitoreó la calidad del anticuerpo durante la duración del cultivo y se muestra una tendencia significativa a la alza a lo largo del tiempo para las especies ácidas y una tendencia a la baja para las especies neutras en el lote alimentado, mientras que en cultivos por perfusión la variación en el tiempo no fue significativa.

Una menor abundancia de isoformas ácidas y básicas en los cultivos por perfusión indica una exposición menor del anticuerpo a condiciones perjudiciales dentro del cultivo que pueden llevar a la deamidación, pérdida de lisina C-terminal u otras modificaciones post traduccionales que pueden resultar en variantes ácidas o básicas características del tiempo de residencia y mayor exposición al lisado celular asociado con el cultivo por lotes alimentados (Walther et al. 2019; Walsh et. al 2006).

Qin et al. (2022) realizaron experimentos para comprobar que el tiempo de residencia incide en la calidad del producto, en donde se incubaron muestras de la cosecha por 0, 12 y 48 horas. El pico principal inicialmente fue de 95.4%, pero disminuyó a 94.8% y 92.8% a las 12 y 48 horas, respectivamente, por lo que

concluyen que el tiempo de residencia del producto influye negativamente sobre la calidad.

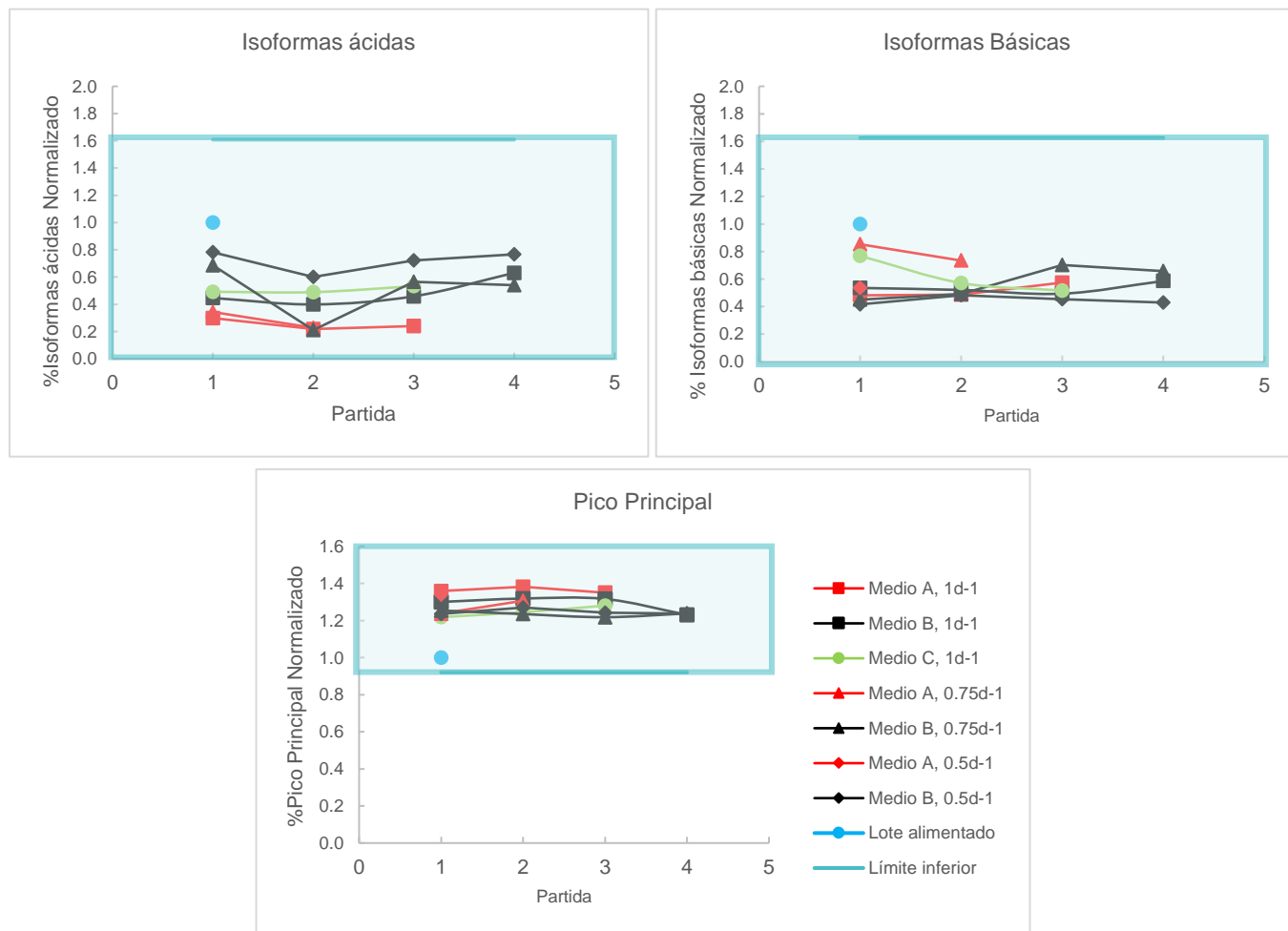


Figura 42 Perfil de variante de cargas con respecto al tiempo. El cuadro azul denota los límites de la especificación.

### 8.5.2 Patrón de N-glicosilación

Se determinó el patrón de N-glicosilación de las muestras tanto de lote alimentado como de los cultivos en perfusión intermitente de acuerdo con la metodología mencionada en el punto 5.5.1. En la Figura 43 se muestra un cromatograma representativo con las estructuras de glicanos propuestas que fue obtenido de las muestras analizadas por UPLC. El tiempo de retención es directamente proporcional a la hidrofobicidad del glicano. Las muestras de glicanos previamente derivatizados

con 2-AB se inyectan en altas concentraciones de un solvente orgánico (acetonitrilo), estos se adsorben a la superficie de la columna y son eluidos por un gradiente acuoso. Es así como los glicanos son separados con base en su hidrofobicidad (los glicanos menos hidrofílicos son los que eluirán primero y los glicanos más grandes o con más grupos hidroxilos son los que eluirán después) (Serrato et al., 2004). Posteriormente se determina el porcentaje de abundancia relativa de cada uno de los glicanos identificados a partir de la integración del área bajo la curva de cada uno de los picos.

Las estructuras identificadas se agruparon como: altos en manosa que se identifican por tener más de tres residuos manosa (M5, M6, M7 y M8), biantenarios o sin residuos de galactosa (A2F ó A2G0), A2G1 (1,6) F ó A2G1(1,3) F (complejo, con un residuo de galactosa), A2G2F (complejo con dos residuos de galactosa), como se muestra en la Figura 43. En la Figura 44 y Tabla 12 se muestran los porcentajes de las fracciones de glicanos promedio para cada cultivo en perfusión y control (lote alimentado), los cuales se encuentran normalizados con respecto a los valores de lote alimentado.

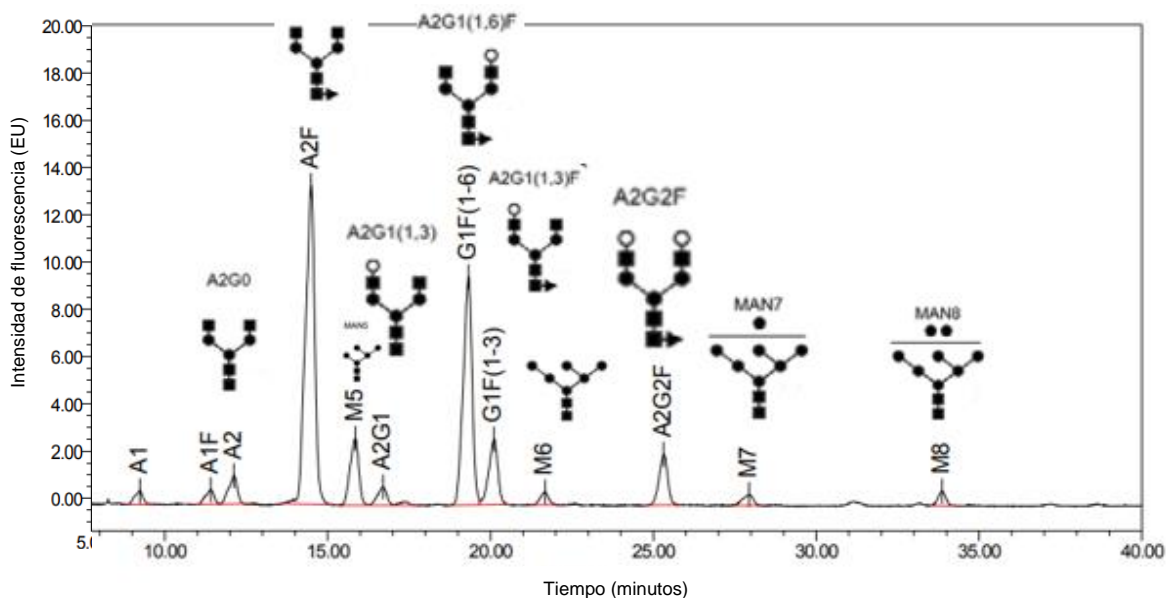


Figura 43 Cromatograma representativo de análisis de patrón de N-Glicosilación. HILIC con columna ACQUITY UPLC BEH Glycan Amide Column, Waters, gradiente de acetonitrilo 100%-formato de amonio 250 mM pH 4.4. Cada nomenclatura representa el glicano que se muestra representado en imagen en el cromatograma dependiendo de su elución.

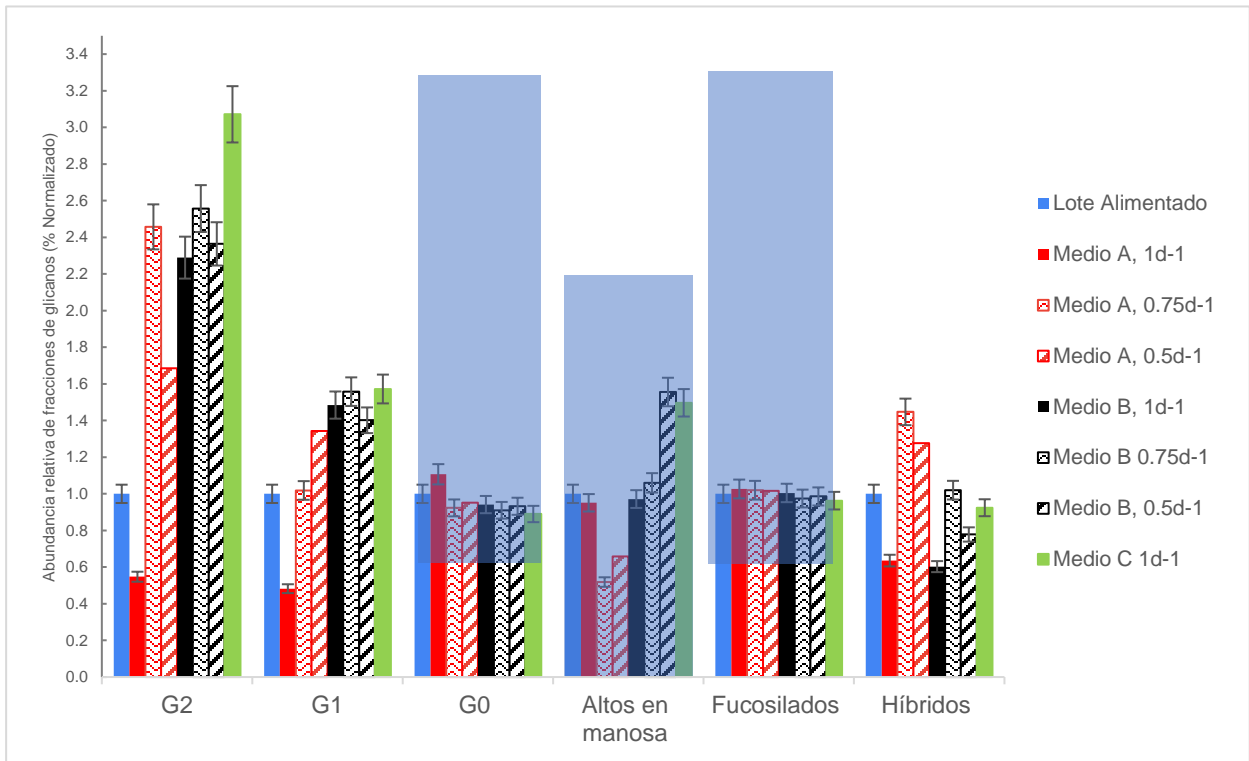


Figura 44 Perfil de N-glicosilación de lote alimentado y perfusión intermitente. Los recuadros azules denotan los límites de especificación.

	G2	G1	G0	Altos en manosa	Fucosilados	Híbridos
<b>Medio A, 1.0 d<sup>1</sup></b>	0.55±0.03	0.48±0.02	1.11±0.06	0.95±0.05	1.03±0.05	0.64±0.03
<b>Medio B, 1.0 d<sup>1</sup></b>	2.29±0.11	1.48±0.07	0.94±0.05	0.97±0.05	1.00±0.05	0.60±0.03
<b>Medio C, 1.0 d<sup>1</sup></b>	3.07±0.15	1.57±0.08	0.89±0.04	1.50±0.07	0.96±0.05	0.92±0.05
<b>Medio A, 0.75 d<sup>1</sup></b>	2.46±0.12	1.02±0.05	0.92±0.05	0.52±0.03	1.02±0.05	1.45±0.07
<b>Medio B, 0.75 d<sup>1</sup></b>	2.56±0.13	1.56±0.08	0.91±0.05	1.06±0.05	0.97±0.05	1.02±0.05
<b>Medio A, 0.5 d<sup>1</sup></b>	1.69±0.08	1.34±0.07	0.95±0.05	0.66±0.03	1.02±0.05	1.28±0.06
<b>Medio B, 0.5 d<sup>1</sup></b>	2.36±0.12	1.40±0.7	0.93±0.05	1.56±0.08	0.99±0.05	0.78±0.04
<b>Lote Alimentado</b>	1	1	1	1	1	1

Tabla 12. Distribución de N-glicanos de cultivos por lote alimentado y perfusión intermitente

En los recuadros color azul se muestran las especificaciones (de acuerdo con los criterios de calidad establecidos para este producto; ausencia del cuadro indica que no existe especificación; no existen límites de especificación para G1, Híbridos y G2 debido a la cantidad irrelevante que representan) de las fracciones de glicanos para altos en manosa ( $<2.33$ ), G0 ( $>0.77$ ) y fucosilados ( $>0.76$ ), los cuales son valores normalizados con respecto a lote alimentado. Todas las fracciones de glicanos obtenidos para los cultivos por perfusión que tienen especificación entran dentro de esta. Solo se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de abundancia relativa para los grupos de glicanos G1 y G2. El llevar a cabo galactosilaciones más completas (G2) constituye una ventaja para la producción de anticuerpos monoclonales cuando se requiere promover la respuesta de tipo CDC (citotoxicidad dependiente del anticuerpo) como función efectora. Kildegaard et al. (2016) mencionan que, en presencia de glucosa, especialmente en altas concentraciones, las células tienden a canalizar la glucosa para la síntesis de azúcares nucleótidos necesarios para la glicosilación como UDP-Gal. Es decir, ocurre un aprovechamiento de la glucosa como fuente de carbono para la vía de pentosas fosfatos la cual juega un papel fundamental en la síntesis de los precursores de la glicosilación (Martínez et al. 2013).

En la Figura 45 se muestran las abundancias relativas de los glicanos con respecto al tiempo a través del análisis de cada fracción de glicano en la partida que corresponde. El recuadro azul indica la especificación en la que debe de encontrarse el glicano, mientras que la línea horizontal azul representa la media de las fracciones de glicanos. Las especificaciones se obtuvieron de los cultivos de referencia con los que se compara. Las fracciones de glicanos que no tienen recuadro azul no tienen especificación de los cultivos de referencia, sin embargo, se tomó en cuenta sus desviaciones estándar las cuales son indicadas en recuadros verdes (figuras 45 C y D).

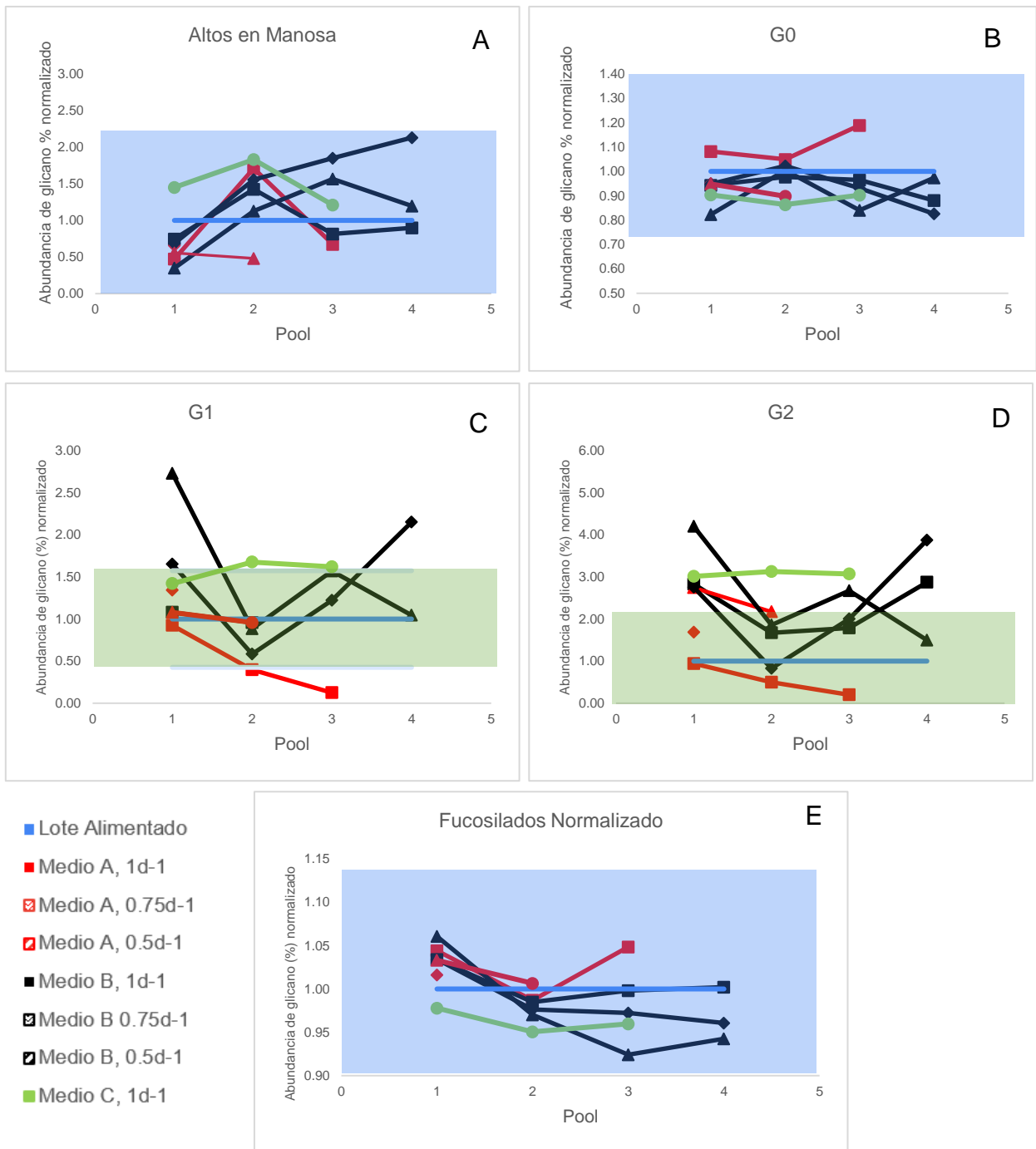


Figura 45 Patrones de N-glicosilación en el tiempo clasificados por principales grupos de glicanos. Los cuadros azules representan las especificaciones de los cultivos referencia (lote alimentado mientras que los cuadros verdes representan la desviación estándar de los cultivos de referencia ya que no se cuentan con especificaciones.

No se encontraron diferencias significativas que alteren las fracciones de glicanos en el tiempo de cultivo, las fracciones de glicanos que cuentan con especificaciones se encuentran dentro de ellas y las fracciones que no poseen especificaciones se encuentran con una variabilidad menor al 10% con respecto a las desviaciones estándar del cultivo de referencia (lotes alimentados). La distribución final de glicanos en el modo de lote alimentado es comparable a las distribuciones que se generan en la fase estacionaria (a partir de la partida 2) de los cultivos por perfusión. La glicosilación de mayor orden, es decir G1 y G2, para los cultivos por perfusión en comparación con lote alimentado (línea azul horizontal) se observa elevada durante el crecimiento celular, mientras que la glicosilación más simple (G0) se mantiene prácticamente estable en la duración de todo el cultivo. La disminución de glicanos G1 y G2 con el tiempo posiblemente se debe a la disminución de la disponibilidad de nutrientes a medida que se pasa de la fase de crecimiento a la fase estacionaria (Walther et al., 2019).

El diseño de los cultivos por perfusión de una manera simplificada en matraces con 3 medios de cultivo distintos permite una comparación directa entre perfusión y lote alimentado. Sin embargo, esto también presenta una posible limitación, puesto que en el presente trabajo ni la línea celular ni los procesos de cultivo fueron optimizados para cultivos en perfusión, tal y como ocurre en otros trabajos en donde se optimizan las líneas celulares para uso específico en perfusión. Lo mismo se puede mencionar sobre el medio utilizado y la optimización de medios de cultivo para obtener distintos patrones de N-glicosilación. A pesar de ello, los resultados presentados en este trabajo, dada la metodología empleada y la simplificación del proceso de perfusión, pueden ser relevantes para tomar decisiones de proceso basadas en la línea celular, medio y datos actualmente disponibles.

## 9. Conclusiones

El sistema modelo de perfusión intermitente implementado en este trabajo permitió alcanzar el doble de la concentración celular comparado con los cultivos de lote alimentado. Posteriormente, los cultivos se estabilizaron en estados estacionarios con baja variabilidad en cuanto a velocidades específicas de crecimiento y atributos de calidad del anticuerpo monoclonal producido. De tal forma, el modelo experimental implementado mostró ser adecuado para simular de manera rápida y económica cultivos reales de perfusión en biorreactores instrumentados. Se determinó que la tasa de perfusión y la duración del cultivo tiene efecto en la concentración y viabilidad celular, además de la producción de AcM.

En los cultivos por perfusión intermitente en matraces puede obtenerse 1.6 veces más cantidad de AcM por tiempo de cultivo que en los cultivos por lote alimentado. Sin embargo, la cantidad de medio utilizado por cantidad de AcM producido es 6.05 veces mayor en los cultivos de perfusión que en los cultivos de lote alimentado. En general, se observa en los resultados que los cultivos por perfusión presentan un mayor consumo de fuente de carbono y nitrógeno conforme la tasas de perfusión aumentan. Por otro lado, se observa que la velocidad específica de producción de anticuerpo puede llegar a ser hasta 2.16 veces más que en un cultivo por perfusión a una tasa de  $1 \text{ d}^{-1}$  empleando el medio B, que en un proceso por lote alimentado.

La calidad del anticuerpo monoclonal producido por perfusión mejoró en variante de cargas con respecto a lo obtenido en lote alimentado ya que se obtiene un menor porcentaje de variantes ácidas (48%) y básicas (49%) y mayor porcentaje (30%) en el pico principal en comparación con los lotes alimentados. El perfil de N-glicosilación fue similar en ambos modos de cultivo con excepción en los glicanos G1 y G2 que aumentaron 1.5 y 2.0 respectivamente, sin embargo, en ningún caso la diferencia fue mayor al 10% con respecto a los cultivos de referencia.

En conjunto, los resultados del presente trabajo evidencian que experimentos en sistemas simplificados y en escalas reducidas como los cultivos de perfusión intermitente o semi continuos en matraces pueden proporcionar resultados equiparables a los cultivos de perfusión en biorreactores instrumentados y, por ende, guiar la optimización del proceso. No obstante, en los cultivos en matraces, variables relevantes, como el oxígeno disuelto y el pH, no son medidas ni controladas, lo que podría limitar una generalización directa de



resultados obtenidos mediante cultivos realizados con equipo instrumentado. Por lo tanto, la optimización del proceso, validación y un posible escalamiento dependerían en última instancia del análisis y comparación de cultivos efectuados en biorreactores instrumentados con un control completo tanto de variables ambientales como de tasas de perfusión continuas. Los resultados preliminares realizados en biorreactores y operados en modo de perfusión formal muestran que, en efecto, el modelo de perfusión intermitente en matraces es una opción adecuada para simular la situación real. De tal forma, los cultivos no instrumentados realizados en matraces podrían ofrecer una base sólida para agilizar y acelerar el desarrollo temprano del proceso de manera práctica y económica.

## **10.Perspectivas**

El sistema en matraces de perfusión intermitente resultó ventajoso por su alta producción de anticuerpo monoclonal, sin embargo, para poder continuar el desarrollo de este proceso continuo es importante realizar cultivos en perfusión con el separador acústico en biorreactores instrumentados comenzando a evaluar con el medio A para estandarizar la técnica y posteriormente poder evaluar las tasas de perfusión y comparar resultados con matraces. Esto con la finalidad de conocer si los cultivos en biorreactor continúan la misma tendencia observada en matraces y observar si la calidad del anticuerpo monoclonal se encuentra inalterable a lo largo del cultivo.

Por otro lado, se podría evaluar el proceso de purificación continua debido a las altas cantidades de medio de cultivo que deben procesarse para purificar el anticuerpo monoclonal.

## 11.Referencias

- Ambrogelly, A., Gozo, S., Katiyar, A., Dellatore, S., Kune, Y., Bhat, R., Sun, J., Li, N., Wang, D., Nowak, C., Neill, A., Ponniah, G., King, C., Mason, B., Beck, A., & Liu, H. (2018). Analytical comparability study of recombinant monoclonal antibody therapeutics. *MAbs*, *10*(4), 513–538. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1438797>
- Becker, M., Junghans, L., Teleki, A., Bechmann, J., & Takors, R. (2019). Perfusion cultures require optimum respiratory ATP supply to maximize cell-specific and volumetric productivities. *Biotechnology and Bioengineering*, *116*(5), 951–960. <https://doi.org/10.1002/bit.26926>
- Bibila, T. A., & Robinson, D. K. (1995). In Pursuit of the Optimal Fed-Batch Process for Monoclonal Antibody Production. *Biotechnology Progress*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1021/bp00031a001>
- Bielser, J. M., Chappuis, L., Xiao, Y., Souquet, J., Broly, H., & Morbidelli, M. (2019). Perfusion cell culture for the production of conjugated recombinant fusion proteins reduces clipping and quality heterogeneity compared to batch-mode processes. *Journal of Biotechnology*, *302*(May), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.06.006>
- Bielser, J. M., Wolf, M., Souquet, J., Broly, H., & Morbidelli, M. (2018). Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing – A critical review. *Biotechnology Advances*, *36*(4), 1328–1340. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.011>
- Burnouf, T., & Radosevich, M. (2001). Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *49*(1–3), 575–586. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00221-4](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00221-4)
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, *50*(1–3), 57–76. <https://doi.org/10.1007/s10616-005-4537-x>
- Chotteau, V. (2015). Animal Cell Culture: Essential Methods. In M. Al-Rubeai (Ed.), *Animal Cell Culture: Essential Methods*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319310320-4>
- Cumming, D. A. (1991). Glycosylation of recombinant protein therapeutics: Control and functional implications. *Glycobiology*, *1*(2), 115–130. <https://doi.org/10.1093/glycob/1.2.115>

- Dhara, V. G., Naik, H. M., Majewska, N. I., & Betenbaugh, M. J. (2018). Recombinant Antibody Production in CHO and NS0 Cells: Differences and Similarities. *BioDrugs*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0319-9>
- Du, Y., Walsh, A., Ehrick, R., Xu, W., May, K., & Liu, H. (2012). Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *MAbs*, 4(5), 578–585. <https://doi.org/10.4161/mabs.21328>
- Europa, A. F., Gambhir, A., Fu, P. C., & Hu, W. S. (2000). Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1), 25–34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000105\)67:1<25::AID-BIT4>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000105)67:1<25::AID-BIT4>3.0.CO;2-K)
- Gomez, N., Barkhordarian, H., Lull, J., Huh, J., GhattyVenkataKrishna, P., & Zhang, X. (2019). Perfusion CHO cell culture applied to lower aggregation and increase volumetric productivity for a bispecific recombinant protein. *Journal of Biotechnology*, 304(August), 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.08.001>
- Gorenflo, V. M., Ritter, J. B., Aeschliman, D. S., Drouin, H., Bowen, B. D., & Piret, J. M. (2005). Characterization and optimization of acoustic filter performance by experimental design methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(6), 746–753. <https://doi.org/10.1002/bit.20476>
- Gränicher, G., Coronel, J., Trampler, F., Jordan, I., Genzel, Y., & Reichl, U. (2020). Performance of an acoustic settler versus a hollow fiber–based ATF technology for influenza virus production in perfusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4877–4888. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10596-x>
- Guile, G. R., Rudd, P. M., Wing, D. R., & Dwek, R. A. (1997). HPLC Strategies for Profiling and Sequencing Oligosaccharides. *A Laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis*, 9, 199–234. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7388-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7388-8_11)
- Ha, T. K., Kim, D., Kim, C. L., Grav, L. M., & Lee, G. M. (2021). Factors affecting the quality of therapeutic proteins in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology Advances*, August, 107831. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107831>
- Henry, O., Kwok, E., & Piret, J. M. (2008). Simpler noninstrumented batch and semicontinuous cultures provide mammalian cell kinetic data comparable to continuous and perfusion cultures. *Biotechnology Progress*, 24(4), 921–931. <https://doi.org/10.1002/btpr.17>

- Hossler, P., Khattak, S. F., & Li, Z. J. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9), 936–949. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp079>
- ICH Q8. (2009). EMEA/CHMP, 2009, ICH Topic Q 8 (R2) Pharmaceutical Development, Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development. *Regulatory ICH*, 8(June). [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002872.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002872.pdf)
- Karst, D. J., Scibona, E., Serra, E., Bielser, J. M., Souquet, J., Stettler, M., Broly, H., Soos, M., Morbidelli, M., & Villiger, T. K. (2017). Modulation and modeling of monoclonal antibody N-linked glycosylation in mammalian cell perfusion reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(9), 1978–1990. <https://doi.org/10.1002/bit.26315>
- Karst, D. J., Steinebach, F., & Morbidelli, M. (2018). Continuous integrated manufacturing of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.015>
- Karst, D. J., Steinhoff, R. F., Kopp, M. R. G., Serra, E., Soos, M., Zenobi, R., & Morbidelli, M. (2017). Intracellular CHO Cell Metabolite Profiling Reveals Steady-State Dependent Metabolic Fingerprints in Perfusion Culture. *Biotechnology Progress*, 33(4), 879–890. <https://doi.org/10.1002/btpr.2421>
- Khawli, L. A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z. W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D., Nijem, I., Allison, D. E., Wong, P. Y., Kao, Y., Quan, C., Joshi, A., Harris, R. J., & Motchnik, P. (2010). Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats Charge variants in IgG1. *mAbs*, 613–624. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13333>
- Kildegaard, H. F., Fan, Y., Sen, J. W., Larsen, B., & Andersen, M. R. (2016). Glycoprofiling effects of media additives on IgG produced by CHO cells in fed-batch bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(2), 359–366. <https://doi.org/10.1002/bit.25715>
- Konstantinov, K., Goudar, C., Ng, M., Meneses, R., Thrift, J., Chuppa, S., Matanguihan, C., Michaels, J., & Naveh, D. (2006). The “push-to-low” approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 101(October), 75–98. [https://doi.org/10.1007/10\\_016](https://doi.org/10.1007/10_016)
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., & Amanullah, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*, 2(5), 466–479. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>

- Maria, S., Bonneau, L., Fould, B., Ferry, G., Albert, J., Cabanne, C., Santarelli, X., & Joucla, G. (2023). Perfusion process for CHO cell producing monoclonal antibody: Comparison of methods to determine optimum cell specific perfusion rate. *Biochemical Engineering Journal*, 191(October 2022), 108779. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108779>
- Martínez, V. S., Dietmair, S., Quek, L. E., Hodson, M. P., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2013). Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2), 660–666. <https://doi.org/10.1002/bit.24728>
- Qin, Y., Ma, R., Li, Y., Li, Y., Chen, G., & Zhou, W. (2022). Productivity and quality improvement for a symmetric bispecific antibody through the application of intensified perfusion cell culture. *Antibody Therapeutics*, 5(2), 111–120. <https://doi.org/10.1093/abt/tbac009>
- Ryll, T., Dutina, G., Reyes, A., Gunson, J., Krummen, L., & Etcheverry, T. (2000). Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: Characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(4), 440–449. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20000820\)69:4<440::AID-BIT10>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20000820)69:4<440::AID-BIT10>3.0.CO;2-0)
- Serrato, J. A., Palomares, L. A., Meneses-Acosta, A., & Ramírez, O. 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. <https://doi.org/10.1002/bit.20232>
- Sha, S., Agarabi, C., Brorson, K., Lee, D. Y., & Yoon, S. (2016). N-Glycosylation Design and Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Trends in Biotechnology*, 34(10), 835–846. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.013>
- Shirgaonkar, I. Z., Lanthier, S., & Kamen, A. (2004). Acoustic cell filter: A proven cell retention technology for perfusion of animal cell cultures. *Biotechnology Advances*, 22(6), 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.03.003>
- Torkashvand, F., & Vaziri, B. (2017). Main quality attributes of monoclonal antibodies and effect of cell culture components. *Iranian Biomedical Journal*, 21(3), 131–141. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijb.21.3.131>
- Varki, A. (2017). Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>

- Villiger, T. K., Scibona, E., Stettler, M., Broly, H., Morbidelli, M., & Soos, M. (2016). Controlling the time evolution of mAb N-linked glycosylation - Part II: Model-based predictions. *Biotechnology Progress*, 32(5), 1135–1148. <https://doi.org/10.1002/btpr.2315>
- Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P. A., Baer, G., & Kadouri, A. (2003). Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(7), 751–765. <https://doi.org/10.1002/bit.10629>
- Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1241–1252. <https://doi.org/10.1038/nbt1252>
- Walther, J., Lu, J., Hollenbach, M., Yu, M., Hwang, C., McLarty, J., & Brower, K. (2019). Perfusion cell culture decreases process and product heterogeneity in a head-to-head comparison with fed-batch. *Biotechnology Journal*, 14(2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/biot.201700733>
- Wolf, M., Bielser, J.-M., & Morbidelli, M. (2020). Perfusion bioreactors: The set-up and process characterisation. *Perfusion Cell Culture Processes for Biopharmaceuticals*, 20–45. <https://doi.org/10.1017/9781108847209.002>
- Wolf, M. K. F., Pechlaner, A., Lorenz, V., Karst, D. J., Souquet, J., Broly, H., & Morbidelli, M. (2019). A two-step procedure for the design of perfusion bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 151(July), 107295. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107295>
- Xu, S., Gavin, J., Jiang, R., & Chen, H. (2017). Bioreactor productivity and media cost comparison for different intensified cell culture processes. *Biotechnology Progress*, 33(4), 867–878. <https://doi.org/10.1002/btpr.2415>
- Young, J. D. (2013). Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1108–1115. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.016>