



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de la toxicidad del dióxido de carbono en células de ovario
de hámster chino (CHO)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ing. Biol. Jorge Campano Valdez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Antonino Báez Rogelio
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

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.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología, del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT 779549) y con el apoyo de Laboratorios Liomont S.A. de C.V.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera y al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, por su recibimiento en el consorcio Palomares-Ramírez y por todo su apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.

A las técnicas académicas del grupo destacando la contribución de cada una. A la M.C. Ruth Pastor por su apoyo en el área de biología molecular. A la M.C. Vanessa Hernández por su contribución en el área analítica. Especialmente a la M.C. Martha Contreras por su asesoramiento y enseñanza.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán y Dr. Antonino Báez Rogelio, por toda su retroalimentación y consejos durante la realización del proyecto.

A los miembros de mi jurado, el Dr. Guillermo Gosset Lagarda, la Dra. Clarita Olvera Carranza, el Dr. Luis Caspeta Guadarrama, la Dr. Amelia Farrés González Sarabia y la Dra. Camina Montiel Pacheco; por el tiempo, consejos y observaciones que fueron más que valiosos para mejorar el presente trabajo.

A Larisa Campos y Karin Levy, por su invaluable apoyo administrativo.

Al Laboratorio Nacional de Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos (LAMMB). En especial a la Dra. Mabel Rodríguez, por las facilidades otorgadas para la realización de experimentos de qPCR.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación, del Instituto de Biotecnología, por su servicio de síntesis de oligonucleótidos.

Al Dr. Takuya Nishigaki y a la M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara, por las facilidades otorgadas y su apoyo en la realización de los experimentos de actividad enzimática.

Al Dr. David Valle García, por su apoyo y disposición durante la planeación y desarrollo de los experimentos de RT-qPCR.

A todos los integrantes de GPR, por sus consejos, apoyo, compañía y amistad.

A Laboratorios Liomont S.A. de C.V.

DEDICATORIA

A mis padres, Angelina Valdez Herrera y Albino Campano Hidalgo, gracias por todo su apoyo, amor y por estar siempre pendiente de mí. Todos mis logros son por y para ustedes.

A mi hermana, Dulce María Campano Valdez, por todo su apoyo, compañía y amistad durante todo este tiempo. Que honor ser tu hermano y tío de Majito.

A Kenya Romero Burgos, por ser mi compañera y amiga, es un placer compartir este viaje contigo. Tú y los Gordos son la razón y luz de mis días. Gracias por todo tu amor, comprensión, apoyo y paciencia en esta aventura.

A mis roomies, Michelle, Rogelio y Kenya; quienes a partir del 2021 me confirmaron la importancia de una buena compañía en tu vida. Gracias por todas las experiencias que compartimos el tiempo que pasamos juntos.

A Fernando, Carlos, Juan Antonio, Brian y Jair; de quienes he tenido la dicha de contar con su amistad durante todos estos años. Gracias por todos esos momentos dentro y fuera del rancho.

A Marco por tu especial compañía durante casi 10 años, se dice mucho parece poco. Gracias por tu amistad, por todos esos conciertos vividos y recuerdos creados.

A Lau, porque a pesar de la distancia has estado ahí. Gracias por tu amistad y compañía, por tus palabras y confianza.

A mis amigos de laboratorio, César, Michelle, Ana y Quetza; gracias por hacer más divertido esta etapa de nuestras vidas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS.....	9
1. RESUMEN.....	11
2. INTRODUCCIÓN.....	13
3. ANTECEDENTES.....	15
3.1. Biofarmacéuticos	15
3.1.1. Mercado.....	16
3.2. Anticuerpos monoclonales	17
3.2.1. Modificaciones postraduccionales.....	19
3.2.2. Aplicaciones.....	23
3.3. Dióxido de carbono.....	24
3.3.1. Equilibrio y disociación.....	26
3.3.2. Transporte.....	27
3.3.3. Efectos en células CHO.....	29
3.4. Genes de interés	36
4. JUSTIFICACIÓN.....	38
5. HIPÓTESIS	39
6. OBJETIVOS	39
6.1. Objetivo general	39
6.2. Objetivos específicos	39
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	40
8. MÉTODOS	42
8.1. Cultivo y mantenimiento celular.....	42
8.1.1. Línea celular y medio de cultivo	42
8.1.2. Banco celular	42
8.1.3. Descongelamiento celular	42
8.1.4. Cultivos en modo lote.....	43
8.2. Métodos analíticos.....	43
8.2.1. Concentración y viabilidad celular.....	43
8.2.2. Cuantificación de metabolitos	44
8.2.3. Cuantificación de anticuerpo monoclonal.....	44
8.2.4. Cuantificación de actividad enzimática.....	45
8.3. Cálculos cinéticos y estequiométricos.....	46

8.3.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento.....	46
8.3.2. Determinación del rendimiento de metabolitos	46
8.3.3. Determinación de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos	47
8.4. Caracterización del anticuerpo monoclonal.....	47
8.4.1. Purificación.....	47
8.4.2. Análisis del patrón de N-glicosilación	48
8.4.3. Análisis de las variantes de carga	49
8.5. Análisis transcripcional	49
8.5.1. Selección de genes de interés.....	49
8.5.2. Diseño de oligonucleótidos.....	50
8.5.3. Extracción, limpieza, cuantificación y verificación de la integridad del ARN total y síntesis de ADN complementario	51
8.5.4. Amplificación de ADN complementario por medio de RT-qPCR.....	52
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
9.1. Cultivos a diferentes condiciones de pCO ₂	54
9.2. Efecto de la pCO ₂ en el metabolismo celular.....	61
9.3. Análisis del anticuerpo monoclonal.....	68
9.3.1. Variantes de carga	68
9.3.2. N-glicosilación.....	72
9.4. Actividad enzimática.....	74
9.5. Efecto de la pCO ₂ sobre la expresión de genes de interés en células CHO	79
9.5.1. Genes relacionados con el metabolismo celular.....	80
9.5.2. Genes relacionados con la producción y modificación del anticuerpo monoclonal...	83
10. CONCLUSIONES.....	86
11. PERSPECTIVAS	88
12. APÉNDICES.....	89
12.1. Curva estándar para la cuantificación de amonio.....	89
12.2. Cromatograma típico de un anticuerpo monoclonal.....	90
12.3. Curva estándar para la cuantificación de la actividad enzimática.....	90
12.4. Curvas de actividad enzimática	91
12.5. Cromatograma típico de análisis de N-glicosilación.....	93
12.6. Geles de agarosa para oligonucleótidos.....	94
12.7. Geles de agarosa para ARN total.....	96
12.8. Curvas de RT-qPCR.....	97
13. REFERENCIAS.....	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventas de los principales tipos de biofarmacéuticos en 2007 y 2018	16
Tabla 2. Principales modificaciones que producen las especies principales, ácidas y básicas de un AcM.	22
Tabla 3. Concentraciones de CO ₂ disuelto correspondientes a distintos % de pCO ₂	26
Tabla 4. Condiciones de purificación del AcM producido.	48
Tabla 5. Genés de interés propuestos para el análisis de sus niveles de expresión bajos distintos niveles de pCO ₂	50
Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para el análisis transcripcional.	51
Tabla 7. Condiciones de amplificación para las reacciones de RT-qPCR.....	53
Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para cultivos de células CHO productoras de AcM a distintas condiciones de CO ₂ atmosférico (0.03, 5 y 20%).	68
Tabla 9. Contenido de lisina removido con CPB del AcM producido a diferentes niveles de pCO ₂	71
Tabla 10. Abundancias relativas de los glicanos identificados en el anticuerpo monoclonal producido a distintos niveles de pCO ₂ atmosférico.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de un anticuerpo tipo IgG	17
Figura 2. Humanización de anticuerpos monoclonales.	18
Figura 3. Reacciones de modificación de glicanos unidos a AcM	20
Figura 4. Tipos de glicanos presentes en los AcM.....	21
Figura 5. Reacciones metabólicas relevantes donde interviene el CO ₂	25
Figura 6. Sistema de transporte y conversión de CO ₂ /HCO ₃ ⁻	28
Figura 7. Estrategia experimental.....	41
Figura 8. Cinética de crecimiento de células CHO productoras de AcM	54
Figura 9. Viabilidad celular de células CHO productoras de AcM.....	57
Figura 10. Variación del pH en cultivos de células CHO productoras de AcM.....	59
Figura 11. Concentración de AcM por células CHO a distintos niveles de pCO ₂	60
Figura 12. Concentración de glucosa por células CHO productoras de AcM	62
Figura 13. Concentración de lactato en cultivos de células CHO productoras de AcM .	63
Figura 14. Concentración de glutamina en cultivos de células CHO productoras de AcM	66
Figura 15. Concentración de glutamato en cultivos de células CHO productoras de AcM	66
Figura 16. Concentración de amonio en cultivos de células CHO productoras de AcM.	67
Figura 17. Abundancia relativa de las variantes de carga del AcM.....	70
Figura 18. Abundancia relativa de las especies básicas antes y después de digestión con CPB	71
Figura 19. Abundancia relativa de los principales glicanos presentes en el AcM	73

Figura 20. Actividad galactosidasa extracelular.....	75
Figura 21. Actividad galactosidasa intracelular.....	76
Figura 22. Actividad manosidasa extracelular	77
Figura 23. Actividad manosidasa intracelular	78
Figura 24. Expresión relativa del gen de la lactato deshidrogenasa (ldhA)	81
Figura 25. Expresión relativa del gen de la glutaminasa (gls)	82
Figura 26. Expresión relativa del gen de la anhidrasa carbónica 5B (ca5B)	83
Figura 27. Expresión relativa de los transgenes de las cadenas ligera y pesada del AcM	84
Figura 28. Expresión relativa del gen de la carboxipeptidasa D (cpD)	85
Figura 29. Curva estándar de cloruro de amonio (NH ₄ Cl).	89
Figura 30. Cromatograma representativo de la cuantificación de un AcM modelo.	90
Figura 31. Curva estándar de 4-metilumbeliferona (4-MU) para la determinación de la actividad enzimática manosidasa y galactosidasa.	91
Figura 32. Actividad galactosidasa extracelular.....	91
Figura 33. Actividad galactosidasa intracelular.....	92
Figura 34. Actividad manosidasa extracelular.....	92
Figura 35. Actividad manosidasa intracelular.....	93
Figura 36. Cromatograma representativo del análisis del patrón de N-glicosilación de un AcM modelo.....	93
Figura 37. Prueba de oligos para el gen ldhA.....	94
Figura 38. Prueba de oligos para los genes gls y cpD.	95
Figura 39. Prueba de oligos para los genes ca5B y gls.....	95
Figura 40. Prueba de oligos para los genes rps16, eif3K y actB.	96
Figura 41. Gel de agarosa para ARN extraído de cultivos a 5% de pCO ₂	96
Figura 42. Gel de agarosa para ARN extraído de cultivos a 0.03 y 20% de pCO ₂	97
Figura 43. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen eif3K	97
Figura 44. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen ldhA	98
Figura 45. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen gls	98
Figura 46. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen ca5B	99
Figura 47. Curvas de RT-PCR obtenidas para el transgén de la cadena pesada del AcM	99
Figura 48. Curvas de RT-PCR obtenidas para el transgén de la cadena ligera del AcM	100
Figura 49. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen cpD	100

ABREVIATURAS

μ : velocidad específica de crecimiento

$[\text{CO}_2]_{\text{liq}}$: concentración de CO_2 disuelta en el líquido

ΔH° : cambio en la entalpía estándar de la reacción

2-AB: 2-aminobenzamida

4-MU: 4-metilumbeliferona

AcM: anticuerpo monoclonal

ADCC: actividad citotóxica dependiente de anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNt: ácido ribonucleico total

Asn: asparagina

BCT: banco celular de trabajo

ca5B: anhidrasa carbónica 5B

CDC: actividad citotóxica dependiente de complemento

CHO: ovario de hámster chino

CO_2 : dióxido de carbono

cpB: carboxipeptidasa B

cpD: carboxipeptidasa D

Ct: ciclo umbral

d CO_2 : dióxido de carbono disuelto

DMSO: dimetilsulfóxido

EPO: eritropoyetina

Fab: fragmento de unión al antígeno

Fc: fracción cristalizable

Glc: glucosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

gls: glutaminasa

GOI: gen de interés (*gen of interest*)

H_2CO_3 : ácido carbónico

H_{CO_2} : constante de Henry para el dióxido de carbono

HCO_3^- : ion bicarbonato

HM: alto en manosa

IgA: inmunoglobulina tipo A

IgD: inmunoglobulina tipo D

IgE: inmunoglobulina tipo E

IgG: inmunoglobulina tipo G

IgM: inmunoglobulina tipo M

ldhA: lactato deshidrogenasa A

ldhB: lactato deshidrogenasa B

Man: manosa

Man5: manosa 5

Man6: manosa 6

Man8: manosa 8

NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

NADH : nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NCAM: molécula de adhesión celular neural

Neu5Gc: ácido N-glicolilneuramínico

OST: oligosacariltransferasa

pCO₂: presión parcial de dióxido de carbono

pHi: pH intracelular

pO₂: presión parcial de oxígeno

PSA: ácido polisiálico

PTM: modificación postraducciona

q_{AcM}: tasa específica de producción de anticuerpo monoclonal

q_{Amm}: tasa específica de producción de amonio

q_{Glc}: tasa específica de consumo de glucosa

q_{Gln}: tasa específica de consumo de glutamina

q_{IgG}: tasa específica de producción de IgG

q_{Lac}: tasa específica de producción de lactato

q_{O₂}: tasa específica de consumo de oxígeno

q_P: tasa específica de producción

q_S: tasa específica de consumo de sustrato

q_{tPA}: tasa específica de producción de tPA

RCF: fuerza centrífuga relativa

RE: retículo endoplásmico

rpm: revoluciones por minuto

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Ser: serina

TCA: ácido tricarbóxico

Thr: treonina

tPA: activador tisular del plasminógeno

UPLC: cromatografía líquida de ultra rendimiento (Ultra-Performance Liquid Chromatography)

Y_{AcM/cel}: rendimiento de anticuerpo producido por célula

Y_{Amm/cel}: rendimiento de amonio producido por célula

Y_{cel/Glc}: rendimiento de célula por glucosa consumida

Y_{cel/Gln}: rendimiento de célula por glutamina consumida

Y_{Glu/Gln}: rendimiento de glutamato producido por glutamina

Y_{Lac/cel}: rendimiento de lactato producido por célula

Y_{Lac/Glc}: rendimiento de lactato producido por glucosa

Y_{P/S}: rendimiento de producto por sustrato

Y_{P/X}: rendimiento de producto por biomasa

Y_{X/S}: rendimiento de biomasa por sustrato

1. RESUMEN

Las células de ovario de hámster chino (CHO) son el principal sistema de expresión de glicoproteínas recombinantes, entre ellas los anticuerpos monoclonales (AcMs), debido a que poseen características deseables como altas tasas de producción y modificaciones postraduccionales (PTM) similares a las presentes en las proteínas humanas. En cultivos celulares, el CO₂ es un parámetro crítico de proceso (CPP) dado a que tiene repercusiones en distintos aspectos del cultivo como el crecimiento y la viabilidad celular, la producción de proteínas recombinantes y el metabolismo celular. Sin embargo, poco se ha reportado sobre el efecto del CO₂ en los atributos de calidad de la glicoproteína de interés, como el patrón de N-glicosilación y el perfil de variantes de carga. Además, no se ha reportado el efecto del CO₂ en procesos moleculares como la transcripción.

En el presente trabajo, se estudió el efecto de tres distintos niveles de presión parcial de CO₂ (pCO₂): 0.03, 5 y 20%, respecto al contenido en la atmósfera de una incubadora, sobre cultivos de células CHO productoras de AcM. Se evaluaron aspectos fisiológicos como el crecimiento celular y la producción de AcM, donde los cultivos a 20% de pCO₂ produjeron una mayor cantidad de proteína. En contraste, los cultivos a 0.03% de pCO₂ presentaron las concentraciones celulares y de AcM más bajas de entre las tres condiciones. Se determinó el patrón de N-glicosilación y el perfil de variantes de carga para el AcM producido en cada una de las condiciones. Los resultados del análisis de N-glicosilación no mostraron diferencias significativas en los niveles de fucosilación y manosilación, mientras que el nivel de galactosilación disminuyó conforme los niveles de pCO₂ incrementaron. Por lo tanto, se tomó la decisión de evaluar la actividad galactosidasa y manosidasa para cada condición. Además, en cuanto al perfil de variantes de carga, se observó un decremento en la abundancia de especies ácidas y básicas conforme los niveles de pCO₂ incrementaron. Este perfil es originado a partir de la variabilidad en la carga de las distintas formas del AcM. Finalmente, los niveles de transcripción de genes involucrados en el metabolismo celular: lactato deshidrogenasa A (*ldhA*), glutaminasa (*gls*) y anhidrasa carbónica 5B (*ca5B*); así como en la producción y modificación de un anticuerpo monoclonal (cadena pesada y ligera del AcM; y *cpD*), fueron evaluados para las tres condiciones a dos tiempos distintos (48 y 120 h). Los

mayores niveles de expresión de los genes *ldhA*, *gls* y *ca5B* se presentaron en la condición de 0.03% de pCO₂, indicando una posible estrategia para contender con el estrés al cual las células estaban sometidas. Por otro lado, no fue posible observar una correlación entre la expresión de los transgenes (IgG HC & LC) del AcM con la producción de este. De acuerdo con los datos obtenidos en el presente trabajo, la generación de variantes básicas del AcM esta más influida por la actividad enzimática de la carboxipeptidasa D que por la expresión de su gen codificante (*cpD*).

El aporte del presente trabajo sobre los niveles de expresión de los genes antes mencionados nos permite ahondar en la comprensión del efecto del CO₂ no solo a nivel fisiológico o metabólico, sino también a nivel transcripcional donde diversas estrategias pueden ser propuestas para la optimización de bioprocesos. No obstante, se necesita un estudio más amplio sobre la transcripción de otros genes para poder correlacionar los fenómenos aquí reportados de manera más completa.

2. INTRODUCCIÓN

La producción recombinante de anticuerpos monoclonales (AcM) para su uso en diversos padecimientos o como método de diagnóstico ha cobrado relevancia a partir de su introducción al mercado biofarmacéutico en 1986. Desde entonces, el número de AcM disponibles ha ido en aumento, llegando a representar alrededor del 80% del total de ventas de biofármacos basados en proteínas.

Las células de ovario de hámster chino (CHO) son utilizadas como el sistema de expresión preferido para la producción a gran escala de proteínas recombinantes terapéuticas debido a las ventajas que presentan respecto a otras líneas celulares. Entre estas ventajas están el crecimiento rápido, la posibilidad de crecerlas en suspensión y la secreción al medio de cultivo de proteínas complejas, correctamente plegadas y activas, similares a las humanas. Sin embargo, los procesos de producción pueden verse afectados por parámetros físicos y químicos que repercuten en el desempeño celular y, por ende, en la producción de la proteína recombinante de interés. Muchos de estos parámetros, como la temperatura, la aireación, el oxígeno disuelto, el pH, entre otros; han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, a pesar de su importancia, la atención dedicada en la literatura al efecto del dióxido de carbono (CO_2) ha sido mucho menor.

El CO_2 puede tener diversos efectos negativos en los cultivos de células CHO. Entre estos efectos están la disminución de la velocidad de crecimiento y de la productividad de la proteína de interés, así como alteraciones en la glicosilación de la proteína recombinante y del metabolismo celular. Asimismo, niveles elevados de pCO_2 pueden producir cambios en el pH intracelular, alterar la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmáticas, así como las propiedades fisicoquímicas del proteoma.

Los estudios del efecto de parámetros relevantes sobre cambios transcripcionales en células CHO han mostrado su utilidad para entender los fenómenos imperantes y proponer estrategias de cultivo y blancos de modificación celular que mejoren los bioprocesos. Ejemplos de esto, incluyen el efecto del estrés por hiperósmosis debido a la adición de sales o el cambio en la temperatura del proceso. Estos trabajos, por ejemplo, han servido para entender mejor las alteraciones de la glicosilación de proteínas

recombinantes causadas por cambios operacionales. No obstante, a la fecha no existen reportes de como el CO₂ puede afectar el nivel transcripcional de genes de diversas vías metabólicas o aquellos que estén involucrados en procesos celulares relevantes.

En el presente trabajo se analizó, mediante RT-qPCR, la respuesta a nivel transcripcional de células de CHO productoras de un AcM expuestas a distintos niveles de pCO₂. Además, se evaluaron fisiológicamente los cultivos, así como los atributos de calidad de un anticuerpo monoclonal producido, como proteína recombinante modelo. Esto con la finalidad de profundizar y ampliar la información existente, y poder proponer mecanismos que permitan dilucidar los efectos ejercidos por los niveles de pCO₂, así como estrategias para mejorar la producción de proteínas recombinantes terapéuticas o profilácticas sintetizadas por células CHO.

3. ANTECEDENTES

3.1. Biofarmacéuticos

El término *biofarmacéutico* hace referencia a aquellas moléculas obtenidas de fuentes biológicas, como órganos, tejidos, microorganismos, fluidos animales o células, y organismos modificados genéticamente; que presentan actividad farmacológica y que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico *in vivo*; y que son producidas mediante el uso de técnicas biotecnológicas como la ingeniería genética y el ADN recombinante (Jozala *et al.*, 2016; Rader, 2008).

Los biofármacos se clasifican en tres principales grupos: proteínas recombinantes, productos basados en células modificadas genéticamente y productos basados en ácidos nucleicos (Walsh & Walsh, 2022). Este tipo de moléculas incluyen a las citocinas, enzimas, hormonas, factores de coagulación, vacunas (tanto proteínicas como nucleotídicas), anticuerpos monoclonales, terapia celular y génica, oligonucleótidos antisentido y péptidos terapéuticos (Sekhon, 2010).

En comparación con los fármacos convencionales, los biofármacos basados en proteínas ofrecen diversas ventajas que los sitúan por encima de los primeros (Leader *et al.*, 2008), como:

- I. Funciones altamente específicas y complejas.
- II. Menor probabilidad de interferir con procesos biológicos y provocar efectos adversos.
- III. Mayor tolerancia por el organismo.
- IV. En algunas enfermedades genéticas pueden actuar como terapia de reemplazo sin necesidad de requerir terapia génica.
- V. En algunos casos, el desarrollo clínico como los procesos de aprobación demoran menos tiempo.

A diferencia de los fármacos convencionales, los biofármacos se distinguen por mantener una estructura de mayor complejidad, así como por presentar distintas modificaciones postraduccionales (PTM) como la N-glicosilación y variantes de carga, que pueden

afectar características como la vida media, solubilidad, estabilidad y eficacia clínica. Además de que cambios en sus propiedades fisicoquímicas pueden provocar respuestas hipersensibles, anafilaxis, reacciones de infusión (aquellas que se presentan al momento de la aplicación del producto terapéutico) o una disminución en la eficacia de los biofármacos (Ryu et al., 2012).

3.1.1. Mercado

Desde la introducción de la insulina producida de manera recombinante en *Escherichia coli* por la compañía Eli Lilly en 1982 (Jagschies, 2018), la cantidad de biofármacos que se encuentran tanto en producción como en pruebas clínicas y aprobados para su uso médico, ha ido en crecimiento debido a la amplia variedad de padecimientos que pueden ser tratados, así como por la eficacia que han demostrado durante sus aplicaciones.

Tan solo en el período comprendido entre enero de 2018 a junio de 2022, 197 productos biofarmacéuticos fueron aprobados, de los cuales 180 correspondían a biofármacos con sustancias activas distintas. Estos se distribuyeron de la siguiente forma: 97 anticuerpos monoclonales, 19 hormonas, 16 productos basados en terapia génica, 16 vacunas, 12 factores estimuladores de colonias, 9 productos basados en terapia celular, 8 enzimas, 7 productos de fusión y 6 factores de coagulación (Walsh & Walsh, 2022). Asimismo, se ha visto un crecimiento en la venta de biofármacos respecto a años anteriores (Tabla 1) (Morrow & Langer, 2019).

Tabla 1. Ventas de los principales tipos de biofarmacéuticos en 2007 y 2018 (Morrow & Langer, 2019).

Producto	Ventas* 2007	Ventas* 2018	Crecimiento 2007-2018 (%)
Proteínas recombinantes	65,300	150,000	230
Anticuerpos monoclonales	19,500	75,000	385
Insulina	4,300	8,400	195
Vacunas	11,000	40,000	364
Cultivos celulares/tejidos	100	1,000	1,000
Productos sanguíneos humanos (factores coagulación, estimuladores de colonia)	15,000	32,000	213
Biogénicos	1,000	3,300	330
Total (biofármacos humanos)	93,300	275,000	296

*Ventas reportadas en millones de dólares

En 2020, el total de ventas ascendió a 325,170 millones de dólares y se espera que para el año 2026 incremente a un total de 496,710 millones de dólares. Este incremento en las ventas del mercado se debe principalmente a los AcM y sus derivados, los cuales contribuyen con hasta un 40% del mercado biofarmacéutico global. Dichas ventas se encuentran lideradas por empresas como Amgen Inc., Eli Lilly & Company, Johnson & Johnson, Sanofi SA, AstraZeneca PLC y Pfizer Inc. (Market Data Forecast, 2020; Markets, 2021).

3.2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcM) son moléculas proteicas conformadas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se asocian para formar tres motivos proteicos independientes (Figura 1). En ambas cadenas se presentan porciones variables, encargadas de proveer la especificidad del anticuerpo por el antígeno, mientras que la región constante de la cadena pesada da lugar a las diferentes clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (García Merino, 2011).

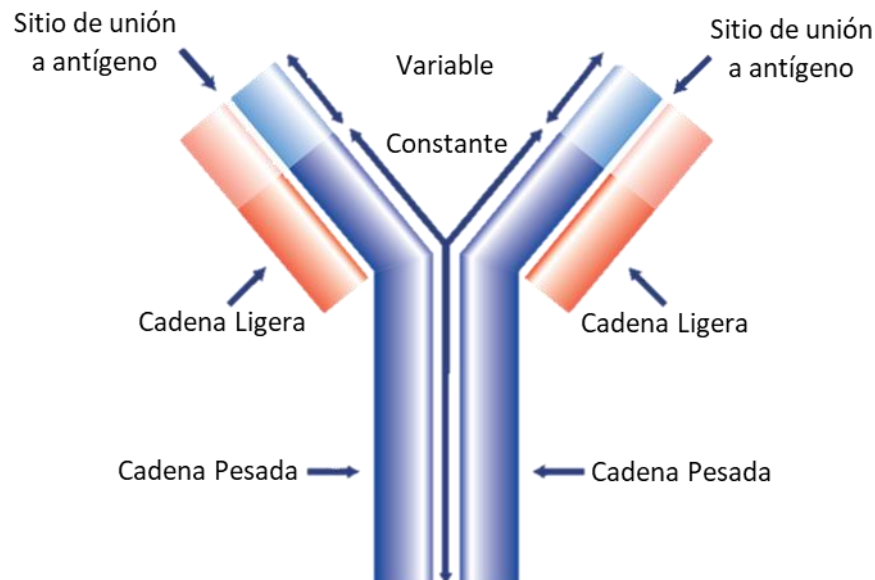


Figura 1. Estructura general de un anticuerpo tipo IgG. Formado por cuatro cadenas peptídicas: dos pesadas (azul) y dos ligeras (rojo). Se aprecian las regiones variables y constantes, así como el sitio de unión a antígeno. Adaptado de Patlak (2009).

Las funciones de los AcM son reconocer y unirse a antígenos a través del extremo N-terminal, mientras que mediante el extremo C-terminal se da su función efectora. Se pueden distinguir dos principales regiones: el fragmento Fab, que presenta el sitio de unión específica a antígeno; y el fragmento Fc, que es una región constante que presenta sitios de interacción para distintos ligandos (García Merino, 2011; Jefferis, 2005).

El primer anticuerpo monoclonal fue completamente murino y derivado de la tecnología de hibridomas. Desde entonces, los AcM se producen por la tecnología del ADN recombinante y ha existido el esfuerzo de humanizarlos, por lo que pueden clasificarse como se muestra en la Figura 2.

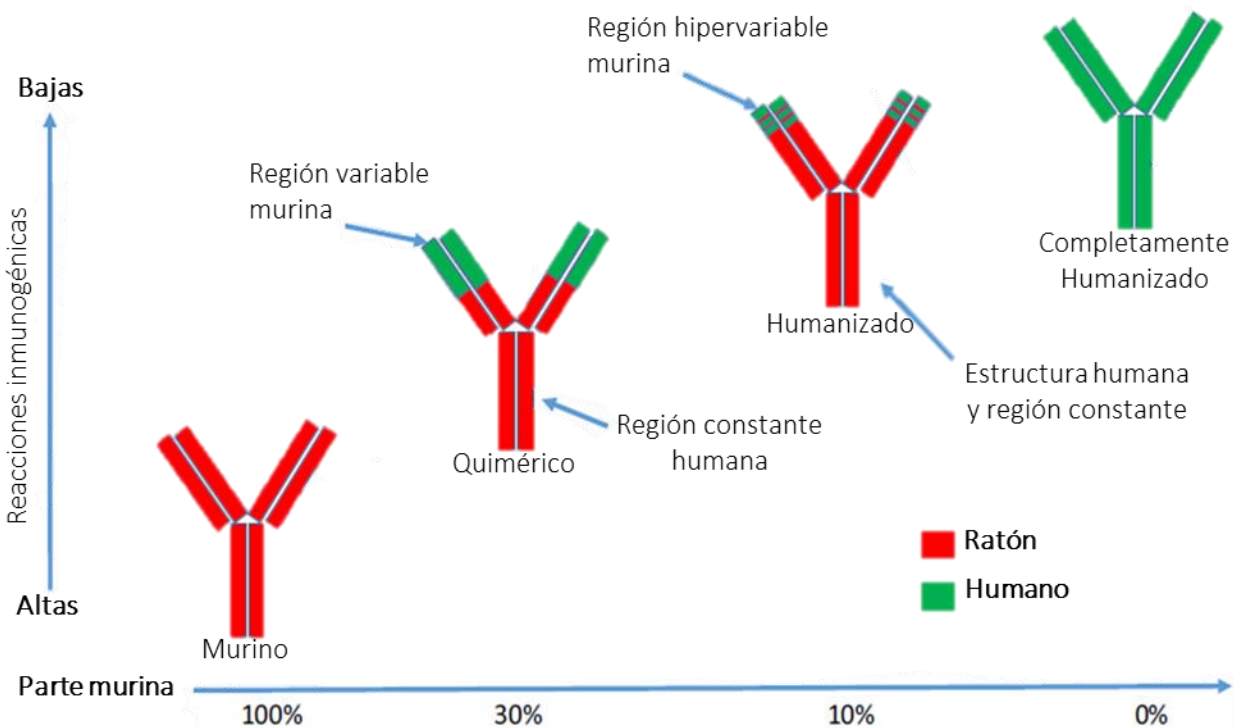


Figura 2. Humanización de anticuerpos monoclonales. Dependiendo de la proporción murina/humana se presenta cierto nivel de inmunogenicidad. Adaptado de Singh et al. (2018).

La humanización busca principalmente reducir la inmunogenicidad y reacciones adversas que pudieran presentarse y, de acuerdo con su proporción murina/humana, se clasifican de la siguiente manera (Mahmuda et al., 2017; Rayasam et al., 2013):

- I. Murinos: provenientes de roedores y producidos por tecnología de hibridoma

- II. Quiméricos: conformados en aproximadamente un 60-70% de secuencias humanas. Combinan secuencias de la región variables de anticuerpo murino con el dominio Fc de un anticuerpo humano.
- III. Humanizados: conformados por aproximadamente un 95% de secuencias humanas.
- IV. Completamente humanizados: conformados en su totalidad por secuencias humanas.

Los anticuerpos quiméricos, humanizados y completamente humanizados pueden producirse por tecnología del ADN recombinante mediante ratones transgénicos, plataformas de despliegue de fagos o cultivos celulares.

3.2.1. Modificaciones postraduccionales

Los atributos de calidad de un anticuerpo monoclonal, como el patrón de N-glicosilación y las variantes de carga, pueden influir en la eficacia terapéutica y biocompatibilidad del biofármaco. Comprender y controlar estas características es esencial para garantizar la seguridad y eficacia durante el diseño, desarrollo y la producción a gran escala de este tipo de terapias.

3.2.1.1. N-glicosilación

La N-glicosilación es una modificación postraducciona (PTM) que consiste en la unión de un oligosacárido al esqueleto polipeptídico de la proteína. Esta PTM inicia en el lado citosólico del retículo endoplásmico (RE), donde el dolicol fosfato actúa como una molécula transportadora de la estructura del precursor del glicano. Distintos azúcares como la glucosa (Glc), manosa (Man) y N-acetilglucosamina (GlcNAc) son agregados hasta que un núcleo conformado por cinco residuos de manosa es elaborado. Una vez formada esta estructura de alto contenido de manosa, es transferida a la proteína mediante la oligosacariltransferasa (OST), la cual es un complejo multimérico proteico localizado en la membrana del RE (Spearman *et al.*, 2011).

Esta estructura de oligosacárido es transferida a una asparagina (Asn) en una secuencia conservada (Asn-X-Ser/Thr) y que generalmente corresponde al residuo 297, que se

localiza en el dominio CH2 de cada cadena pesada en el fragmento Fc, siendo el tipo de glicosilación más común en los AcM. Una vez que el oligosacárido precursor se encuentra unido al AcM, sufre diversas modificaciones en el aparato de Golgi, las cuales consisten en la eliminación y adiciones de distintos monosacáridos (Figura 3). Estas reacciones son catalizadas por enzimas como glicosidasas y glicosiltransferasas, respectivamente, que dan lugar a las diversas estructuras presentes en los AcM. La variación en la presencia o ausencia de los glicanos unidos a la glicoproteína da lugar a la macroheterogeneidad de la misma. Mientras que la variación de cada uno de los glicanos de manera individual, es decir, las diversas estructuras que se presentan de estos, se refiere a la microheterogeneidad (Jefferis, 2005; Jennewein & Alter, 2017; Spearman *et al.*, 2011).

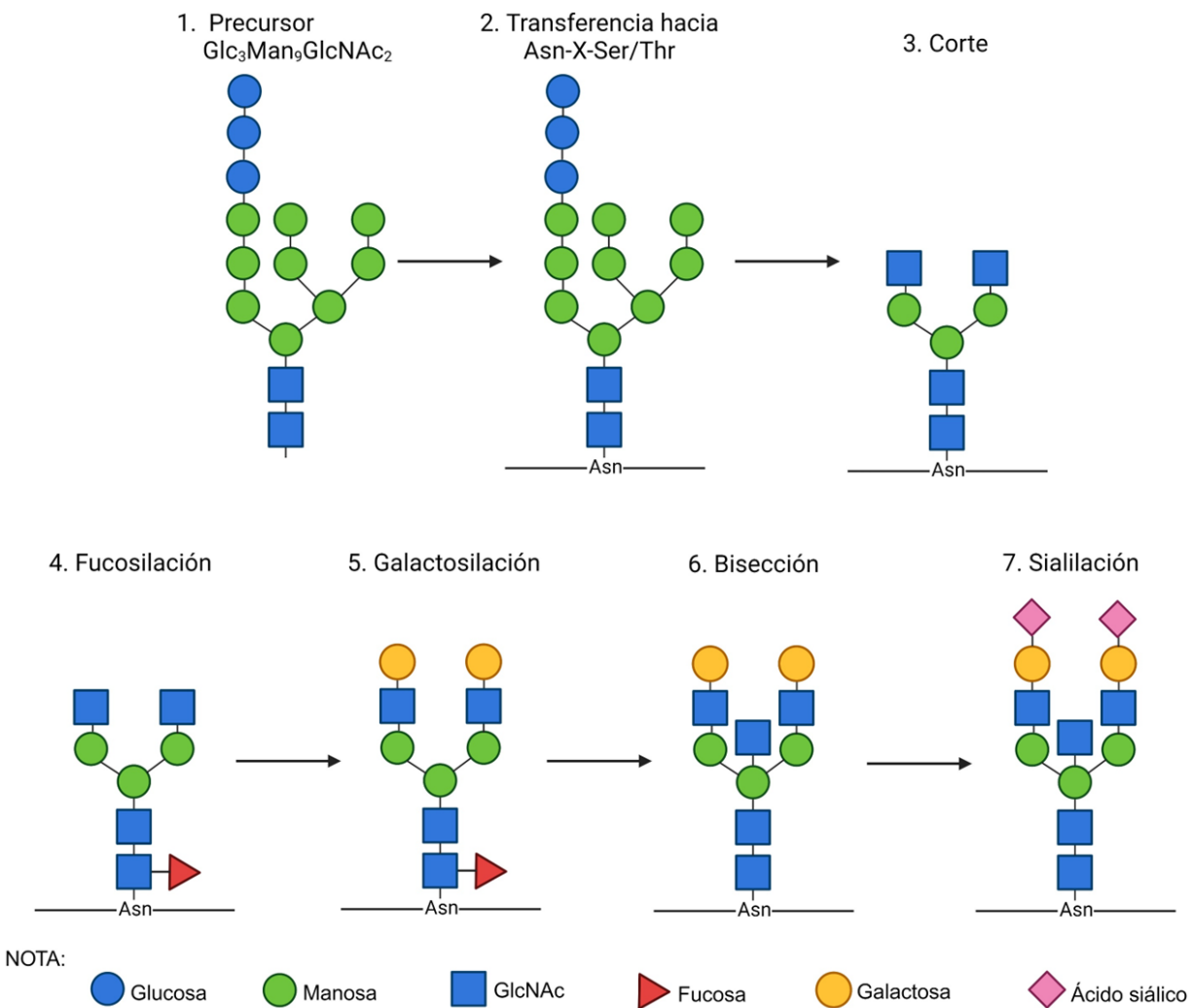


Figura 3. Reacciones de modificación de glicanos unidos a AcM. Adaptado de Jennewein & Alter (2017), creado con BioRender.com (2023).

Tanto la macro como la micro heterogeneidad son importantes porque definen la funcionalidad del AcM, afectando las características de interés de este tipo de glicoproteínas como su estabilidad, eficacia *in vivo*, actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y dependiente de complemento (CDC), la farmacocinéticas, la tasa de remoción del torrente sanguíneo y la inmunogenicidad(Spearman *et al.*, 2011; Torkashvand & Vaziri, 2017).

Dependiendo del tipo de ramificación que presentan los N-glicanos, estos pueden clasificarse en tres grupos (Figura 4) (Torkashvand & Vaziri, 2017):

- I. Altos en manosa (HM): presentan únicamente residuos de manosa unido al núcleo del glicano y una ADCC mejorada.
- II. Complejos: contienen distintos monosacáridos en la región antenal del glicano. Dependiendo del residuo será la característica que pueda verse afectada en el AcM.
- III. Híbridos: mantienen propiedades tanto de los glicanos HM como de los complejos.

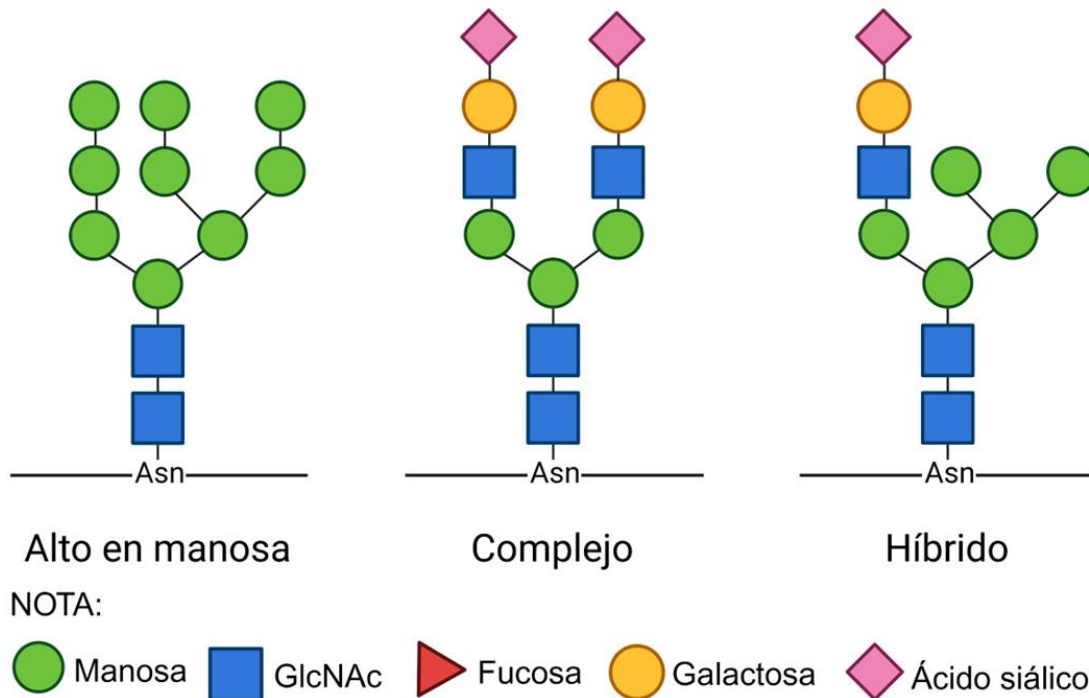


Figura 4. Tipos de glicanos presentes en los AcM. Los tres tipos de glicanos comparten un núcleo formado por dos residuos de N-acetilglucosamina y tres residuos de manosa, las diferencias se presentan en las distintas ramificaciones. Adaptado de Torkashvand & Vaziri (2017), creado con BioRender.com (2023).

3.2.1.2. Variantes de carga

Las variantes de carga de un AcM se refieren a las diferentes variantes de la proteína que se originan debido a cambios en su carga eléctrica. Estas variantes pueden clasificarse en especies principales, ácidas y básicas, y están definidas por su tiempo de retención. En un sistema de cromatografía de intercambio catiónico (CEX), las especies principales corresponden al pico de mayor tamaño, mientras que las especies ácidas y básicas eluyen antes y después que el pico principal, respectivamente. (Du *et al.*, 2012).

La formación de las tres especies es resultado de diversos procesos enzimáticos y químicos de modificación y degradación de la proteína, como la desamidación, oxidación, isomerización y fragmentación, entre otros (Torkashvand & Vaziri, 2017). En la Tabla 2, se muestran las principales modificaciones que dan lugar a las especies principales, ácidas y básicas.

Tabla 2. Principales modificaciones que producen las especies principales, ácidas y básicas de un AcM.

Especie	Modificación
Ácida	Desamidación
	Glicación
	Cisteinilación
	Fragmentación
	Enlaces disulfuro reducidos
Principal	Ciclación de la glutamina N-terminal
	Remoción de lisina C-terminal
	N-glicosilación
Básica	Remoción incompleta de lisina C-terminal
	Isomerización del aspartato
	Amidación de glicina
	Formación de succinimida
	Oxidación de metionina
	Ausencia de N-glicosilación

Adaptado de (Du *et al.*, 2012; Eon-Duval *et al.*, 2012; Khawli *et al.*, 2010; Torkashvand & Vaziri, 2017)

La importancia de las variantes de carga radica en su capacidad para influir sobre diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas *in vitro* e *in vivo* del AcM, tales como la eficacia terapéutica, estabilidad y solubilidad, farmacocinética y biodistribución, y actividad biológica (Du *et al.*, 2012; Eon-Duval *et al.*, 2012; Torkashvand & Vaziri, 2017). Además, la comprensión de este atributo de calidad permite optimizar el diseño, producción y aplicación de diferentes glicoproteínas como los AcM.

3.2.2. Aplicaciones

A nivel clínico, las diversas aplicaciones que se les puede dar a los AcM incluyen terapias humanas, supresión de la respuesta inmune, diagnóstico de enfermedades, diagnóstico de alergias, pruebas hormonales, identificación de tipos celulares, preparación de vacunas y como potenciadores de fármacos (Ansar & Ghosh, 2013). La forma en que actúan los AcM al utilizarlos como agentes terapéuticos es a través de respuestas como (Jefferis, 2005; Waldmann, 1991):

- I. Acarreamiento y liberación de sustancias como fármacos, toxinas, radioisótopos o enzimas.
- II. Neutralización de moléculas solubles
- III. Agonistas o antagonistas de actividad celular
- IV. Inducción de apoptosis en células blanco

Como agentes terapéuticos su aplicación incluye padecimientos como distintos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes, metabólicas, genéticas e infecciones: asma, enfermedades cardiovasculares y hematológicas; degeneración macular, artritis, entre otras (Mahmuda *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018). Adicionalmente, los AcM son moléculas fundamentales para aplicaciones en diagnóstico, empleando distintos formatos en ensayos inmunológicos, así como en bioprocesos para purificación de proteínas.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en cultivos de células de mamífero, como las células CHO. En estos sistemas, variables como el CO₂, pueden repercutir en el cultivo como en la calidad de la proteína recombinante; por lo que conocer este tipo de fenómenos resulta crucial para la optimización de los procesos biotecnológicos.

3.3. Dióxido de carbono

El dióxido de carbono (CO_2) es imprescindible para los cultivos celulares y cuya principal función es regular el pH del cultivo a niveles fisiológicos (Maniarasu & Mohan Kumar, 2022). A nivel metabólico, el flujo celular principal de CO_2 se da a través de reacciones de carboxilación y descarboxilación involucradas en el metabolismo central del carbono (Blombach & Takors, 2015). Las principales reacciones de carboxilación se encuentran catalizadas por las enzimas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa, mientras que las reacciones de descarboxilación están catalizadas por las enzimas fosfoenolpiruvato carboxicinasa, enzima málica, oxalacetato descarboxilasa, y el complejo de la piruvato deshidrogenasa (Figura 5). Además, interviene en el equilibrio ácido-base a través de la reacción reversible de hidratación que sufre el CO_2 , y que es catalizadas por la enzima anhidrasa carbónica. De esta forma actúa el CO_2 como regulador de diversas vías metabólicas (Dubey *et al.*, 2021; Guais *et al.*, 2011), por lo que puede influir en características fundamentales del cultivo como la velocidad de crecimiento, la producción y calidad de un producto, y en el pH intracelular (pHi) (Dubey *et al.*, 2021; Maniarasu & Mohan Kumar, 2022).

De igual manera, el CO_2 tiene impacto a nivel molecular a través de mecanismos que involucran la transducción de señales y la consiguiente regulación genética. Este efecto ha sido ampliamente estudiado en otros modelos celulares como microorganismos y diversas líneas celulares de mamífero, para los que se ha reportado que el CO_2 puede desencadenar una serie de respuestas mediante distintas proteínas sensoras y vías de señalización (Azzam *et al.*, 2010; Stretton & Goodman, 1998; Taylor & Cummins, 2011). Por otra parte, se han realizado estudios transcripcionales en modelos celulares inferiores como *E. coli* (Baez *et al.*, 2009), *Pseudomonas putida* (Follonier *et al.*, 2013) y *Saccharomyces cerevisiae* (Aguilera *et al.*, 2005) para evaluar el impacto del CO_2 en la respuesta molecular de la célula. No obstante, para nuestro conocimiento, aún no se ha estudiado el impacto del CO_2 a nivel transcripcional en modelos celulares superiores productores de proteínas recombinantes como las células CHO. Por esta razón, la principal contribución del presente trabajo es la evaluación del impacto del CO_2 en los niveles de expresión de distintos genes relacionados con el metabolismo, y con la producción y modificación de un anticuerpo monoclonal modelo.

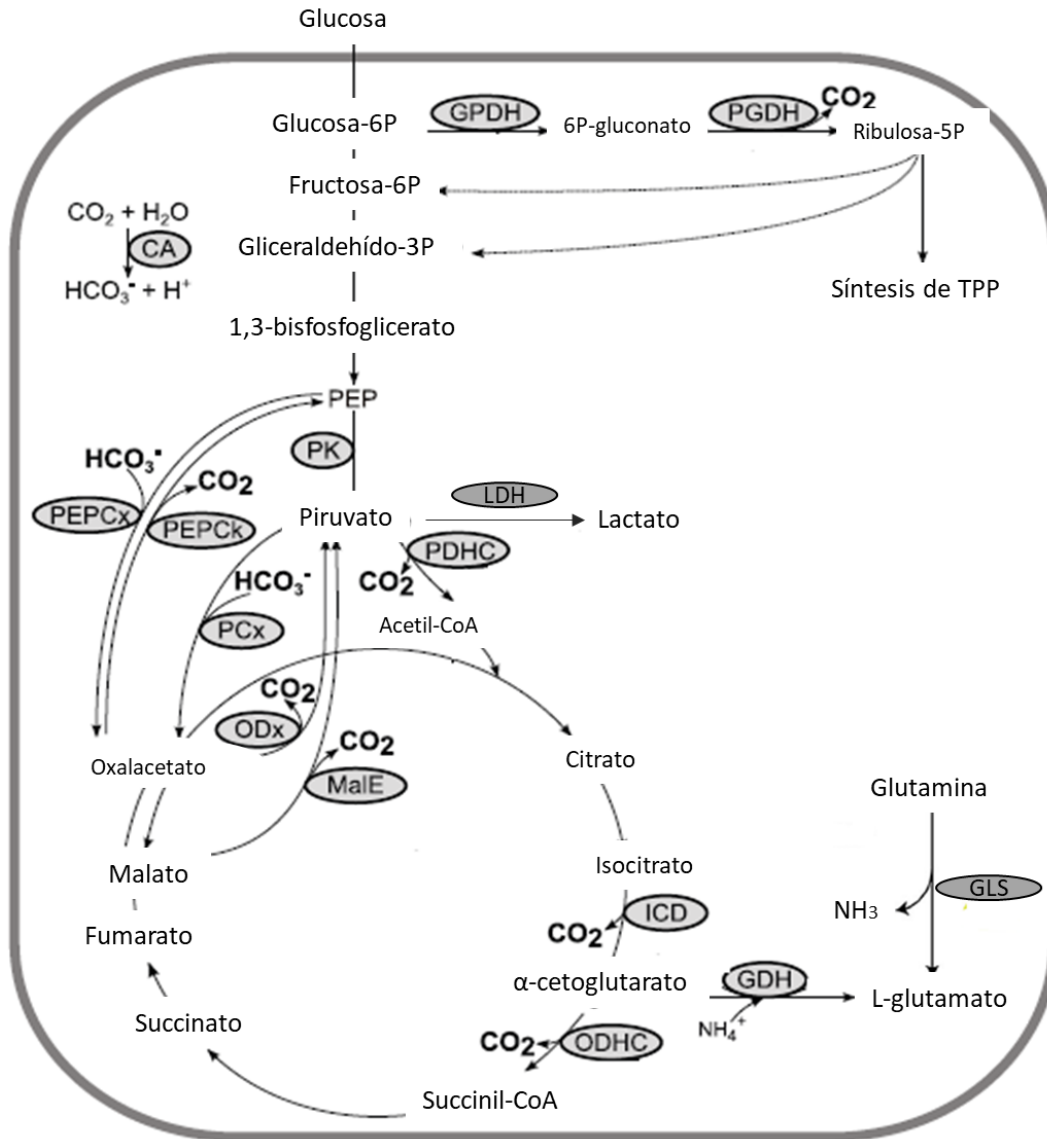


Figura 5. Reacciones metabólicas relevantes donde interviene el CO_2 . Se pueden observar las diferentes reacciones de carboxilación/descarboxilación donde el sistema $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ interviene, incluyendo la glicólisis, reacciones anapleróticas, ciclo del TCA y el sistema regulado por la anhidrasa carbónica. Además, se incluyen las vías de producción de lactato y consumo de glutamina. CA = anhidrasa carbónica; GDH = glutamato deshidrogenasa; GLS = glutaminasa; GPDH = glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; ICD = isocitrato deshidrogenasa; LDH = lactato deshidrogenasa; MalE = enzima málica; ODHC = complejo de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa; ODx = oxalacetato descarboxilasa; PCx = piruvato carboxilasa; PDHC = complejo de la piruvato deshidrogenasa; PEPCx = fosfoenolpiruvato carboxilasa; PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxinasa; PGDH = fosfogluconato deshidrogenasa. Adaptado de Blombach & Takors (2015).

3.3.1. Equilibrio y disociación

Una manera de describir la solubilidad del CO₂ es mediante la ley de Henry. Con este modelo la dependencia de variables como la temperatura o la fuerza iónica del medio puede ser consideradas (Sander, 2015):

$$[CO_2]_{liq} = H_{CO_2} * pCO_2 \quad (1)$$

donde $[CO_2]_{liq}$ es la concentración de CO₂ en la fase acuosa, H_{CO_2} es la constante de Henry y pCO_2 es la presión parcial del CO₂.

A su vez, la constante de Henry puede ser determinada en función de la temperatura mediante la siguiente ecuación:

$$H_{CO_2}(T) = \ln K - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad (2)$$

donde $H_{CO_2}(T)$ es la constante de Henry en función de la temperatura, ΔH° es el cambio en la entalpía estándar de la reacción, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta y K es la constante de equilibrio de la reacción. Para un sistema acuoso a 37 °C, $H_{CO_2} = 25 \text{ mmol bar}^{-1} \text{ L}^{-1}$ (Blombach & Takors, 2015).

De esta manera, las concentraciones de dCO₂ para un sistema acuoso a 37 °C y 1 atm de presión pueden ser estimadas con la ley de Henry para distintos valores de pCO₂ como se muestra en la Tabla 3. No obstante, es importante destacar que en esta aproximación si lo que se mide o regula es la concentración atmosférica del CO₂, entonces el aporte metabólicos del dCO₂ producido por parte de las células no está considerado.

Tabla 3. Concentraciones de CO₂ disuelto correspondientes a distintos % de pCO₂.

pCO ₂		dCO ₂
%	mmHg	mg/L
0.03	0.23	0.33
5	38	55.73
10	76	111.46
20	152	222.92

* Valores estimados a 1 atm de presión y 37 °C de temperatura, sin considerar el aporte metabólico.

En un buffer de bicarbonato, el CO₂ actúa como regulador del pH mediante el sistema CO₂/HCO₃⁻. En este sistema, el CO₂ sufre una reacción de hidratación de acuerdo con la siguiente reacción (Blombach & Takors, 2015):



Si bien, la hidratación del CO₂ conlleva la formación de ácido carbónico, este actúa únicamente como intermediario de la reacción neta. Debido a que el equilibrio entre el sistema H₂CO₃/HCO₃⁻ se encuentra por debajo de pH 7 (pKa = 3.77); en condiciones fisiológicas, con valores de pH cercanos a 7.2, se tiende a favorecer la acumulación de HCO₃⁻ (Nelson *et al.*, 2014). De esta forma, el CO₂ repercute directamente en el pH del medio, dado que al incrementar la pCO₂ habría una mayor cantidad de CO₂ disuelto (dCO₂) que tendería a la formación de HCO₃⁻ y H⁺, y la consiguiente disminución del pH.

3.3.2. Transporte

Existen dos principales formas mediante las cuales se da el flujo de CO₂ hacia el interior o exterior celular: difusión a través de la membrana celular o transporte mediado por proteínas.

La difusión del CO₂ a través de la membrana está sujeta a dos factores que pueden afectar la permeabilidad del gas (Boron *et al.*, 2011; Endeward *et al.*, 2017):

- I. Presencia/ausencia de canales proteicos para el transporte de gases
- II. Contenido de colesterol en la membrana

Se ha reportado que el contenido de colesterol es el principal determinante de la permeabilidad del CO₂ en membranas carentes de canales de gas. En membranas con mayor contenido de este lípido, la permeabilidad decrece; mientras que membranas con niveles menores de colesterol son más permeables al CO₂ (Boron *et al.*, 2011).

Por otro lado, las proteínas transportadores tienen las funciones de secretar y metabolizar el HCO₃⁻ así como de regular el pH y el volumen celular. Se encuentran clasificadas en tres principales grupos (Bonar & Casey, 2008; Cordat & Casey, 2009; Sterling *et al.*, 2001):

- I. Intercambiadores neutros de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$
- II. Co-transportadores de HCO_3^- acoplados Na^+
- III. Intercambiadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependientes de Na^+

La anhidrasa carbónica puede facilitar el transporte del dióxido de carbono a través de sistemas como (Enns, 1967):

- A. Transporte por flujo: la enzima incrementa la cantidad de HCO_3^- disuelto disponible
- B. Transporte por difusión: la enzima moviliza la difusión del HCO_3^-
- C. Transporte del CO_2 por la enzima misma

Además, esta enzima puede actuar en conjunto con los transportadores de membrana, catalizando las reacciones de hidratación-deshidratación del CO_2 para acelerar el transporte del HCO_3^- , maximizando el gradiente de este ion a través de la membrana (Figura 6) (Boron, 2010; Casey, 2006).

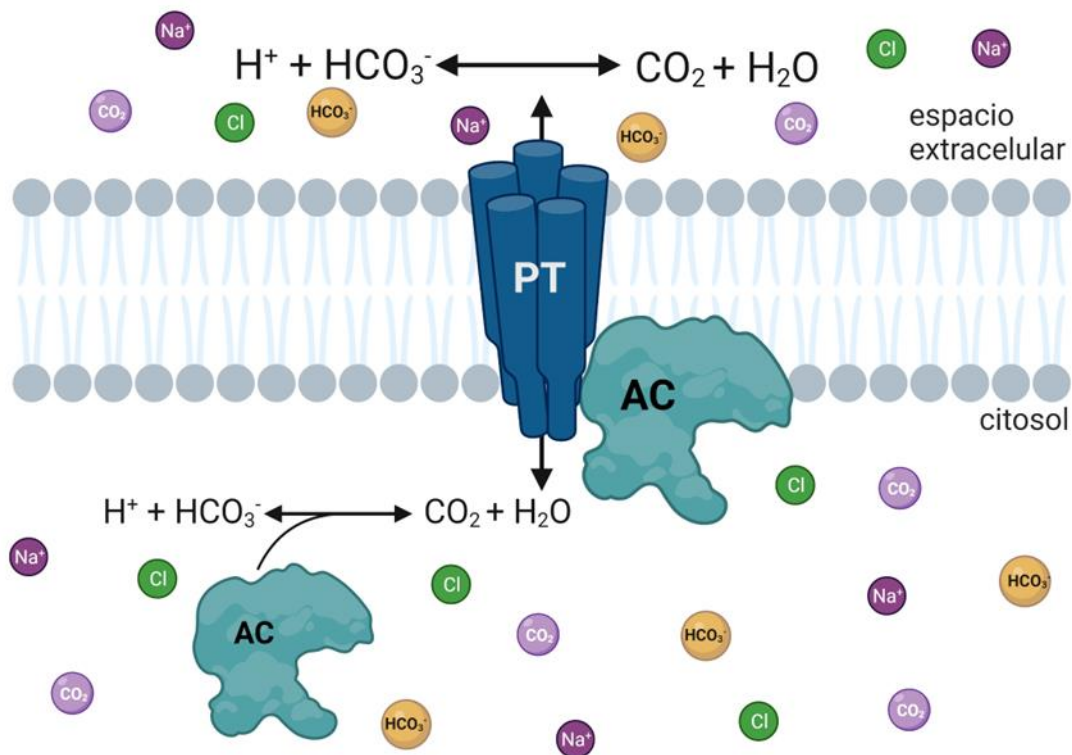


Figura 6. Sistema de transporte y conversión de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. La reacción de hidratación/deshidratación del CO_2 es catalizada por la enzima anhidrasa carbónica (AC), citosólica o transmembranal. De esta forma, tanto el CO_2 como el HCO_3^- se encuentran disponibles para su intercambio con iones como el Na^+ o el Cl^- mediante la acción de distintas proteínas transportadores (PT). Figura creada con BioRender.com (2023).

3.3.3. Efectos en células CHO

Diversos estudios han investigado los efectos que diferentes niveles de CO₂ tienen en cultivos celulares y han determinado que afecta principalmente el crecimiento y viabilidad celular, productividad, así como el metabolismo. A continuación, se resumen los trabajos que se han realizado utilizando las células CHO como sistema de expresión y en los que se ha estudiado el efecto del CO₂.

3.3.3.1. Crecimiento y viabilidad celular

En biorreactores de 10 L operados en perfusión, presiones parciales de CO₂ mayores a 99 mmHg causaron una disminución de la densidad y la viabilidad celular en el estado estacionario. El incremento de 35 a 148 mmHg de pCO₂, resultó en una disminución de la concentración celular de 8.9x10⁶ a 5.9x10⁶ células mL⁻¹. En cultivos realizados en matraces agitados, se observó una inhibición en el crecimiento celular cuando la incubadora se operó a 76 y 152 mmHg de pCO₂ (Gray *et al.*, 1996).

De igual forma, se ha estudiado el efecto de niveles elevados de CO₂ en conjunto con altas osmolalidades. Se observó la disminución en la velocidad específica de crecimiento (μ) de hasta un 30% cuando se utilizaron 250 mmHg de pCO₂ y osmolalidad de 310 mOsm kg⁻¹. Mientras que hubo una mayor disminución en μ a pCO₂ elevada (250 mmHg) cuando no se controló la osmolalidad (376 mOsm kg⁻¹) en comparación con la osmolalidad ajustada a 310 mOsm/kg⁻¹. No se encontraron efectos significativos al utilizar osmolalidades elevadas en las condiciones control de pCO₂ (36 mmHg) (Kimura & Miller, 1996). En experimentos realizados en biorreactores de 2 L operados en modo lote alimentado, se evaluó el efecto de niveles elevados de pCO₂ a pH constante. No se observaron efectos significativos tanto en el crecimiento como en la viabilidad celular en las distintas condiciones evaluadas de pCO₂ (60, 100 y 150 mmHg) y osmolalidad estable (350-370 mOsm kg⁻¹). En condiciones donde no se controló la osmolalidad (168 mmHg de pCO₂ y 375 mOsm kg⁻¹), μ disminuyó en un 30% respecto a la condición control (90 mmHg de pCO₂ y 325 mOsm kg⁻¹) (Zhu *et al.*, 2005).

Se ha investigado el efecto combinado de niveles elevados de pCO₂ con variaciones en la concentración de glucosa en el medio. En cultivos realizados en modo lote a 5, 20 y

40% de pCO₂, y con pH controlado a 6.8, el crecimiento celular presentó la mayor inhibición a 40% de pCO₂. Por otro lado, en cultivos realizados en perfusión, la velocidad específica de crecimiento disminuyó de 0.021 a 0.009 h⁻¹ al incrementar los niveles de pCO₂ de 50 a 220 mmHg en condiciones de alta glucosa (33 mM). De manera similar, μ disminuyó de 0.03 a 0.008 h⁻¹ al incrementar la pCO₂ de 50 a 220 mmHg en condiciones de glucosa limitada (6 mM), mientras que la viabilidad celular decreció conforme los niveles de pCO₂ incrementaron (Takuma *et al.*, 2007).

Al investigar el efecto de distintos niveles de pCO₂ (10 y 20%) y temperaturas (33 y 37 °C), con tres líneas celulares distintas cultivadas en matraces agitados; se reportó una mayor concentración para una línea celular (4x10⁶ células mL⁻¹) a 37 °C independientemente de la pCO₂ utilizada, en comparación con la concentración alcanzada para las otras dos líneas celulares (2x10⁶ células mL⁻¹) (Darja *et al.*, 2016). Sin embargo, a 33 °C y 20% de pCO₂ se presentó una inhibición en el crecimiento para las tres líneas celulares utilizadas. Interesantemente, la viabilidad se mantuvo estable (95-98%) para las tres líneas en cada una de las condiciones evaluadas.

Además de la osmolalidad, el pH y la pCO₂, la presión parcial de oxígeno (pO₂) es otro parámetro crítico para los cultivos de células CHO. Por ejemplo, cultivos en lote fueron realizados en biorreactores de 3 L para evaluar la interacción de pCO₂ (5, 12.5 y 20%), pH (6.8, 7.0 y 7.2) y pO₂ (10, 25 y 40%) (Brunner *et al.*, 2017). En este trabajo, se observó que niveles altos de pCO₂ afectaron negativamente el crecimiento celular, mientras que valores altos de pH y pO₂ lo estimularon.

Además de los estudios sobre el impacto de niveles altos de pCO₂, también se ha investigado el efecto de concentraciones bajas de CO₂. En cultivos a 0.03% de pCO₂, correspondiente a la presión parcial atmosférica del ambiente, no se observó crecimiento en comparación con las otras condiciones evaluadas (Gray *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 2001). En cultivos de células CHO productoras de eritropoyetina (EPO) recombinante con distintos valores de pCO₂ (0.5-5%) se observó un crecimiento normal a lo largo del cultivo, alcanzando una concentración celular máxima de 15.3x10⁶ células mL⁻¹ a las 72 h de cultivo (Yoon *et al.*, 2001).

3.3.3.2. Metabolismo

Además de impactar en el crecimiento celular, los efectos que el CO₂ puede causar a nivel metabólico en células de mamífero, como las células CHO, han sido ampliamente reportados. Efectos en las tasas específicas de producción y consumo de metabolitos clave como la glucosa, glutamina y lactato, pueden verse afectados por diferentes niveles (altos o bajos) de pCO₂, ya sea por si solas o en conjunto con altas osmolalidades.

En cultivos en lote, el consumo de glucosa se vio altamente inhibido al utilizar 40% de pCO₂. En esta condición, la tasa de consumo específico de glucosa (q_{Glc}) disminuyó a 66 nmol 10⁶ células⁻¹ h⁻¹ en comparación con las otras dos condiciones que presentaron valores similares entre sí; 196 y 208 nmol 10⁶ células⁻¹ h⁻¹ a 5 y 20% de pCO₂ respectivamente. Al igual que la q_{Glc} , la tasa específica de producción de lactato (q_{Lac}) presentó valores similares para 5 y 20% de pCO₂, 262 y 265 nmol 10⁶ células⁻¹ h⁻¹ respectivamente; mientras que a 40% de pCO₂ su valor disminuyó hasta 113 nmol 10⁶ células⁻¹ h⁻¹. Al operar en modo perfusión, no se reportaron efectos significativos en las tasas de consumo específicas de glucosa (q_{Glc}) y glutamina (q_{Gln}), o en la tasa de producción específica de amonio (q_{Amm}) debido al incremento de pCO₂, mientras que tanto la q_{Lac} y el rendimiento lactato-glucosa ($Y_{Lac/Glc}$) incrementaron conforme la pCO₂ incrementó de igual forma (Takuma *et al.*, 2007).

Al estudiar el impacto de la pCO₂ (10 y 20%) a distintas temperaturas (33 y 37°C) se obtuvieron diversos comportamientos en q_{Glc} , q_{Lac} y q_{Gln} para tres líneas celulares evaluadas (Darja *et al.*, 2016). A 37 °C, tanto q_{Glc} como q_{Lac} disminuyeron al incrementar pCO₂ de 10 a 20% para todas las líneas celulares. Por otra parte, q_{Gln} no presentó diferencias al incrementar la pCO₂ en una de las tres líneas evaluadas, las dos restantes siguieron la misma tendencia que q_{Glc} y q_{Lac} ; ambas tasas disminuyeron al incrementar la pCO₂.

Otras investigaciones que han utilizado distintas condiciones de pH (6.8, 7.0 y 7.2), pCO₂ (5, 12.5 y 20%) y pO₂ (10, 25 y 40%) en biorreactores operados en modo lote alimentado han reportado que tanto q_{Glc} como q_{Lac} fueron significativamente influenciados por el pH, pero no se observaron efectos significativos tanto de pO₂ y pCO₂ sobre estas variables (Brunner *et al.*, 2017). No se observaron efectos significativos de ninguna de las tres

variables estudiadas sobre q_{Gln} o q_{Amm} . Sin embargo, los cultivos realizados a pH de 7.0 y 7.2 consumieron antes la glutamina, independientemente del nivel de pCO_2 utilizado.

Además de niveles elevados de pCO_2 , bajas concentraciones de este gas también pueden alterar el comportamiento metabólico celular. En cultivos donde se utilizaron niveles $\leq 5\%$ de pCO_2 se observó un incremento en el consumo de glucosa y en la producción de lactato. En condiciones de CO_2 atmosférico (0.03%) tanto q_{Glc} como q_{Lac} presentaron los valores más altos, 0.25 y 0.47 $\mu mol 10^6 \text{ células}^{-1} mL^{-1}$, respectivamente; en comparación con la condición control de 5% de pCO_2 , 0.18 y 0.29 $\mu mol 10^6 \text{ células}^{-1} mL^{-1}$ para q_{Glc} y q_{Lac} , respectivamente (Yoon *et al.*, 2001).

En células de mamífero, el lactato es uno de los principales metabolitos producidos a partir del consumo de glucosa y de glutamina (Li *et al.*, 2022). Especialmente, las células CHO poseen la característica de poder cambiar de la producción de lactato a su consumo para poder ser utilizado como fuente de carbono (Zagari *et al.*, 2013). Se ha estudiado el efecto que tienen los niveles elevados de pCO_2 sobre este cambio metabólico. En cultivos realizados en modo lote con 20% de pCO_2 , el lactato comenzó a ser catabolizado únicamente cuando tanto la glutamina como la glucosa habían sido consumidas en su totalidad (Brunner *et al.*, 2018). Mientras que, en cultivos en modo lote alimentado, se produjo lactato durante el tiempo que duró el cultivo a 20% de pCO_2 en comparación con los cultivos control (12.5% de pCO_2), donde el lactato comenzó a consumirse a las 120 h de cultivo. De igual forma, en este trabajo se reportó que q_{Glc} , q_{Lac} y q_{O_2} presentaron valores menores a 20% de pCO_2 en comparación con los cultivos control antes del cambio metabólico.

3.3.3.3. Producción de proteína recombinante

En reactores de 10 L en modo perfusión, la productividad específica de un antígeno viral disminuyó en aproximadamente un 50% al incrementar la pCO_2 de 35 a 148 mmHg (Gray *et al.*, 1996). De manera similar, el incremento de pCO_2 disminuyó la productividad específica de tPA (q_{tPA}) (Kimura & Miller, 1996). Al incrementar pCO_2 de 36 a 140 y 195 mmHg, y bajo osmolalidad constante de 310 mOsm kg^{-1} , la q_{tPA} disminuyó en un 10 y 33%, respectivamente. Mientras que, en cultivos donde la osmolalidad no fue controlada, la q_{tPA} se mantuvo estable o incrementó al incrementar pCO_2 a 195 y 250 mmHg. En

experimentos realizados por Zhu y colaboradores (2005), pCO₂ (140-160 mmHg) y osmolalidades elevadas (400-450 mOsm kg⁻¹) no afectaron de manera significativa la producción de una proteína de fusión. De manera similar, no se reportaron efectos en la producción de un anticuerpo a condiciones elevadas de pCO₂ (20%) y distintas temperaturas (33 y 37 °C) (Darja *et al.*, 2016).

En cultivos en lote, se han observado productividades específicas de anticuerpo similares con niveles de 5 y 20% de pCO₂, alcanzando 17.7 y 17.8 pg célula⁻¹ día⁻¹, respectivamente (Takuma *et al.*, 2007). Sin embargo, al incrementar pCO₂ a 40%, la tasa de productividad específica (q_P) disminuyó significativamente a 12.8 pg célula⁻¹ día⁻¹. Por otro lado, en cultivos en perfusión bajo condiciones de glucosa limitada (6 mM), la productividad específica del anticuerpo disminuyó en un 14% entre 50-220 mmHg de pCO₂. En contraste, en condiciones de alta glucosa (33 mM) no se observó un efecto claro del pCO₂ sobre q_P.

Los parámetros de cultivo pueden afectar significativamente la productividad específica de un anticuerpo monoclonal. Brunner y colaboradores (2017) estudiaron la combinación de condiciones inadecuadas de pH, pO₂ y pCO₂, y encontraron disminuciones hasta el 30% de las q_P máximas que obtuvieron. Tales autores reportaron un mayor efecto del pH de entre todas las condiciones evaluadas, de manera que los menores valores de q_P se obtuvieron en condiciones de pH bajo.

Por otro lado, niveles bajos de pCO₂ pueden afectar en la producción de proteínas recombinantes. En cultivos realizados a 0.03% de pCO₂, tanto la concentración intra y extracelular, como la productividad específica de EPO, fueron mayores en comparación con los cultivos con CO₂ ajustado en la incubadora del 0.5-5% (Yoon *et al.*, 2001). De manera similar, en cultivos de células CHO productoras de tirotrina, se reportó un incremento del 61% en la producción de la proteína cuando los cultivos fueron realizados a 0.03% de pCO₂ en comparación con los cultivos control a 5% de pCO₂ (Oliveira *et al.*, 2008).

3.3.3.4. Efectos en atributos de calidad: N-glicosilación y variantes de carga

Dentro de la producción de glicoproteínas recombinantes por células de mamífero se encuentran dos atributos de calidad principales: N-glicosilación y variantes de carga. Estas modificaciones son originadas a través de diversos mecanismos tanto enzimáticos como químicos (Eon-Duval *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2008). Se ha reportado que distintos niveles de pCO₂ pueden alterar el perfil de dichos atributos.

Distintas proteínas recombinantes han presentado efectos diferentes en su perfil de N-glicosilación en niveles elevados de pCO₂. Para el activador tisular del plasminógeno (tPA) producido a 250 mmHg de pCO₂, no se reportaron variaciones significativas en el contenido de glicanos altos en manosa; mientras que se observó una disminución en el contenido de ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (Kimura & Miller, 1997). Estudios en proteínas más sensibles al CO₂ han sido estudiadas, como la molécula de adhesión de células neuronales (NCAM), la cual es una proteína superficial presente en células CHO y sensible a las condiciones de cultivo. Se observó una disminución del 20-30% en el contenido de ácido polisiálico (PSA) en esta proteína a 150-200 mmHg de pCO₂. No obstante, la mayor inhibición de la sialilación, aproximadamente 80%, se presentó a valores elevados de pCO₂ y pH, 125 mmHg y 7.45, respectivamente (Zanghi *et al.*, 1999). En un anticuerpo producido en dos concentraciones de glucosa (6 y 33 mM), no se observaron efectos significativos de distintos niveles de pCO₂ utilizados (5, 20 y 40%) en el grado de galactosilación de la glicoproteína (Takuma *et al.*, 2007). En un AcM producido en modo lote alimentado, se reportaron efectos del pH y pCO₂ en conjunto sobre los niveles de sialilación y manosilación de la glicoproteína. Se observó un menor grado de sialilación a mayores valores de pCO₂ y de pH, 250 mmHg y 7.2 respectivamente. Mientras que se presentó un mayor contenido de glicanos Man6 y Man8; a pH de 6.8 y 7.2; y 20 y 5% de pCO₂, respectivamente (Brunner *et al.*, 2017).

Un anticuerpo murino de tipo IgG_{2A} presentó un mayor grado de galactosilación de aproximadamente 112% al incrementar la pCO₂ de 40 a 250 mmHg en condiciones de osmolalidad ajustada a 320 mOsm kg⁻¹. Mientras que la presencia de glicanos altos en manosa disminuyó al incrementar tanto la pCO₂ (de 40 a 250 mmHg) como la osmolalidad (de 375 a 476 mOsm kg⁻¹). Asimismo, no se observaron cambios en el grado de

fucosilación y no se detectaron glicanos sialidados en todas las condiciones evaluadas (Schmelzer & Miller, 2002).

En condiciones de 0.03% de pCO₂, no se reportaron cambios significativos en el patrón de N-glicosilación de tirotopina (Oliveira *et al.*, 2008) y eritropoyetina (Yoon *et al.*, 2001) recombinantes en comparación con las proteínas producidas en condiciones control (5% de pCO₂). No obstante, el suministro de CO₂ favoreció la presencia de glicanos tri- y tetra-antenarios, en comparación con la condición de 0.03% de pCO₂, donde los glicanos biantenarios fueron los predominantes (Oliveira *et al.*, 2008).

De igual forma, se han realizado investigaciones sobre el efecto que tiene el CO₂ en los perfiles de variantes de carga de distintas proteínas recombinantes. No se reportaron cambios significativos en la distribución de cargas de tPA producido a una pCO₂ de 250 mmHg (Kimura & Miller, 1997) ni en tirotopina humana recombinante producida a 0.03% de pCO₂ (Oliveira *et al.*, 2008) en comparación con la condición control a 5% de pCO₂.

No obstante, cambios en la distribución de cargas se han podido observar para distintos tipos de anticuerpos. En cultivos en modo lote a 12.5% de pCO₂, se observó una dependencia del pH en la abundancia de isoformas tanto ácidas como básicas. Bajos niveles de pH dieron lugar a una mayor abundancia de isoformas básica, mientras que respecto a las isoformas ácidas se obtuvieron distintos comportamientos dependiendo de la modificación que dio lugar a este tipo de variante (Brunner *et al.*, 2017). Por otra parte, en condiciones de osmolalidad controlada, un anticuerpo murino producido en medio suplementado con suero presentó un menor punto isoeléctrico cuando la pCO₂ incrementó de 40 a 250 mmHg. En contraste, niveles elevados de pCO₂ no afectaron de manera significativa el punto isoeléctrico de este mismo anticuerpo producido en medio libre de suero (Schmelzer & Miller, 2002).

3.4. Genes de interés

Para nuestro interés, los genes de interés mencionados a continuación fueron seleccionados con base en distintos criterios. Como se menciona en la sección 3.3.3.2., diversos efectos han sido reportados a nivel metabólico respecto al consumo o producción de glutamina y lactato, por lo que los genes *ldhA* y *gls* son un buen blanco para analizar. El gen que codifica para la isoforma A de la lactato deshidrogenasa (*ldhA*) fue seleccionado debido a que el lactato es uno de los principales metabolitos de desecho producido por células CHO que, sin embargo, dependiendo de la condición del cultivo puede ser catabolizado (Li *et al.*, 2022; Zagari *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que distintos niveles de pCO₂ pueden alterar tanto la producción como el consumo de lactato (Brunner *et al.*, 2018; Darja *et al.*, 2016). De manera similar, el gen que codifica para la glutaminasa (*gls*) se seleccionó debido a que la glutamina actúa tanto como fuente de nitrógeno, para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos, como de carbono, reabasteciendo intermediarios al ciclo del TCA (DeBerardinis *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2020). A través de la alteración de los flujos metabólicos en glicólisis y en el ciclo del TCA debido a distintos niveles de CO₂, la glutaminólisis podría verse indirectamente afectada modificando el consumo de glutamina.

El gen de la anhidrasa carbónica 5B (*ca5B*) se seleccionó por la importancia que tiene el sistema CO₂/HCO₃⁻ en el equilibrio ácido-base intracelular (Maniarasu & Mohan Kumar, 2022). Esta enzima puede contribuir al transporte del CO₂ acelerando la interconversión de CO₂ a HCO₃⁻ y, maximizando el gradiente electroquímico a través de la membrana celular (Boron, 2010; Enns, 1967). Además, la isoforma 5B se encuentra localizada en la mitocondria (Fujikawa-Adachi *et al.*, 1999), organelo donde el ciclo del TCA se lleva a cabo, por lo que este gen es un buen reportero del estado metabólico de la mitocondria.

Por otra parte, los transgenes correspondientes a la cadena ligera y pesada del anticuerpo fueron propuestos porque, como se mencionó anteriormente, se ha reportado ampliamente que distintos niveles de pCO₂ pueden alterar la producción de proteínas recombinantes como los AcM o la EPO. El gen de la carboxipeptidasa D fue estudiado por dos principales razones: i) se ha reportado que niveles elevados de pCO₂ pueden alterar la formación de variantes de carga de proteínas recombinantes (Brunner *et al.*,

2017; Schmelzer & Miller, 2002) y ii) se ha confirmado que la isoforma D de la enzima es la responsable de realizar los cortes de los residuos de lisina C-terminal en células CHO (Hu et al., 2016), dando lugar a la formación de especies básicas del AcM.

Finalmente, el gen de referencia (*housekeeping*) fue seleccionado con base en lo reportado en la literatura, donde diferentes estudios han evaluado la estabilidad de diversos genes de referencia en una amplia variedad de condiciones (Bahr et al., 2009; Ma et al., 2020), en los que el gen de la subunidad K del factor 3 de iniciación de la traducción (*ef3K*) mostró un bajo coeficiente de variación. Los genes de la proteína ribosomal S16 (*rps16*) y de la actina B (*actB*), también fueron propuestos siguiendo el mismo criterio del valor del coeficiente de variación. Cabe mencionar que estos dos últimos genes tuvieron que ser descartados durante la ejecución de los experimentos (ver Apéndice 12.6).

4. JUSTIFICACIÓN

Varios estudios han reportado los efectos que ejerce el CO₂ en cultivos de células CHO productoras de glicoproteínas recombinantes. Sin embargo, es importante destacar que estas investigaciones han focalizado su atención en aspectos fisiológicos como el crecimiento y la viabilidad celular, la productividad y el metabolismo celular. Mientras que la información sobre los atributos de calidad de las glicoproteínas, como el perfil de N-glicosilación y las variantes de carga, es limitada. Por estas razones, resulta importante analizar estas variables en respuesta a distintos niveles de pCO₂, debido a que esta molécula suele suministrarse como parte de los requerimientos en cultivos de células de mamífero, además de su producción intrínseca como parte del metabolismo celular. Estos efectos en los parámetros antes mencionados comprometen los procesos de producción de la proteína de interés, así como la calidad, eficacia y seguridad de la proteína recombinante en su aplicación terapéutica.

Por otra parte, aún no se han reportado trabajos en el que el enfoque sea el estudio de la respuesta transcripcional de genes selectos a diferentes niveles de pCO₂. En este sentido, la aportación del presente trabajo es ampliar la información existente sobre los efectos tóxicos que mantiene la pCO₂ en cultivos de células CHO a nivel molecular, mediante el reporte de los cambios en los niveles de expresión de genes seleccionados por su relevancia metabólica. Los resultados obtenidos permitirán una comprensión más profunda y una explicación de estos efectos, lo que a su vez contribuirá a la optimización continua de estos bioprocesos.

5. HIPÓTESIS

Los niveles altos (20%) y bajos (0.03%) de pCO₂ tendrán un impacto negativo en la respuesta fisiológica de cultivos de células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal, y modificarán los niveles de expresión de genes selectos relevantes. Estos efectos se manifestarán a través de la alteración del crecimiento celular, el consumo y la producción de metabolitos, así como en la producción del AcM y sus atributos de calidad.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de distintos niveles de pCO₂ sobre la fisiología, la respuesta transcripcional y dos atributos de calidad (variantes de carga y N-glicosilación) de un anticuerpo monoclonal producido por células CHO.

6.2. Objetivos específicos

- a. Estudiar el impacto de distintos niveles de pCO₂ en los parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos de células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal.
- b. Analizar el efecto sobre las variantes de carga y el patrón de N-glicosilación de un anticuerpo monoclonal producido a distintos niveles de pCO₂.
- c. Determinar el impacto de distintos niveles de pCO₂ sobre la actividad enzimática de galactosidasas y manosidasas, tanto intracelular como extracelular.
- d. Analizar los cambios en los niveles de expresión causados por cambios en la pCO₂, de los genes *ldhA*, *gls*, *ca5B* y *cpD*, y de los transgenes de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal mediante RT-qPCR.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Figura 7 se muestra la estrategia experimental que se siguió en el desarrollo del presente proyecto. Se establecieron cultivos en matraces agitados con tres distintas condiciones de CO₂ atmosférico (0.03, 5 y 20%). Los niveles de 5 y 20% fueron controlados mediante su ajuste en la incubadora. Para la condición de 0.03% de pCO₂, no se suministró CO₂ a través de la incubadora, la única aportación exógena fue el CO₂ presente en la atmosfera (0.03% de pCO₂).

Los niveles de pCO₂ atmosférico establecidos se mantuvieron constantes a lo largo de los cultivos. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado para cada condición, los cultivos a 5% pCO₂ fueron utilizados como grupo de control. Esta condición se estableció de acuerdo con las necesidades de cultivo de la línea celular, para la que es común utilizar niveles del 5-10% de CO₂. Esto se debe a que el medio de cultivo contiene un sistema buffer de carbonato-bicarbonato, el cual regula el pH a valores fisiológicos en ausencia de células. Se determinaron los parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos mediante la cuantificación de la concentración y viabilidad celular, así como la medición de la concentración de metabolitos extracelulares y de anticuerpo monoclonal.

El AcM producido se recolectó cuando la viabilidad celular alcanzó valores iguales o inferiores al 70% y se purificó por medio de cromatografía de afinidad con proteína A. Para determinar el patrón de N-glicosilación, se llevó a cabo una digestión enzimática de los glicanos, los cuales fueron posteriormente marcados y separados mediante cromatografía de interacción hidrofílica. Además, la distribución de las variantes de carga se evaluó utilizando cromatografía de intercambio catiónico. Asimismo, se cuantificó la actividad enzimática de las glicosidasas (galactosidasa y manosidasa) mediante la digestión de sustratos fluoróforos.

Finalmente, para el análisis transcripcional, se extrajo el ARN mensajero (ARNm) total y se amplificaron los genes de interés por medio de RT-qPCR. Para este análisis, se realizaron dos muestreos: a las 48 y 120 horas de cultivo. Los genes evaluados incluyeron: *ldhA*, *gls*, *ca5B* y *cpD*, así como los transgenes para la cadena pesada (IgG HC) y ligera (IgG LC) del anticuerpo monoclonal.

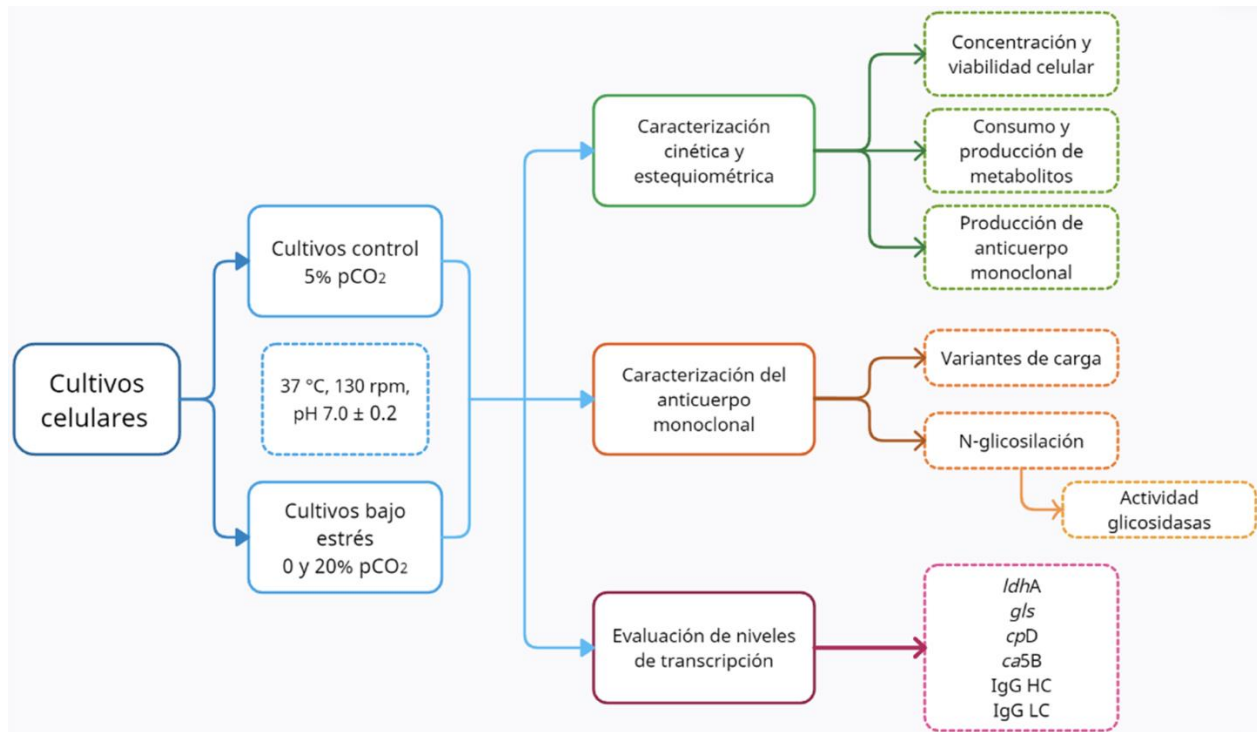


Figura 7. Estrategia experimental. Se realizaron cultivos celulares a tres condiciones distintas de CO₂ atmosférico (0, 5 y 20%). Estos niveles se mantuvieron constantes durante todo el cultivo, a partir de los cuales se realizó su caracterización cinética y estequiométrica, se evaluaron los niveles de expresión de un anticuerpo monoclonal modelo y se caracterizaron dos de sus atributos críticos de calidad (variantes de carga y el patrón de N-glicosilación). Finalmente, se evaluaron los niveles de transcripción de genes relevantes, para entender el efecto del CO₂.

8. MÉTODOS

8.1. Cultivo y mantenimiento celular

8.1.1. Línea celular y medio de cultivo

Se utilizaron células de ovario de hámster chino (CHO) productoras de un anticuerpo monoclonal, las cuales fueron proporcionadas por la empresa Liomont SA de CV. Se utilizó un medio de cultivo químicamente definido (por cuestiones de confidencialidad no descrito) y libre de componentes animales, el cual fue suplementado con glutamina a una concentración final de 6 mM a partir de una solución stock 200 mM.

8.1.2. Banco celular

A partir de un subcultivo en pase 10, se realizó un banco celular de trabajo (BCT). Para la creación del BCT se determinó tanto la concentración como la viabilidad celular. Se tomó el volumen necesario de células con una viabilidad $\geq 95\%$ y en fase de crecimiento exponencial, posteriormente se centrifugó a temperatura ambiente y 128 RCF durante 5 min, eliminando el exceso de medio acondicionado. Se preparó un medio de congelación utilizando 45% de medio acondicionado, 45% de medio fresco y 10% de DMSO. El *pellet* celular se resuspendió en el medio de congelación para preparar alícuotas de 1 mL en crioviales previamente etiquetados. Estos crioviales, con una concentración de 10^7 células mL^{-1} , se almacenaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas, y posteriormente se transfirieron a tranques con nitrógeno líquido para su conservación.

8.1.3. Descongelamiento celular

Para la propagación del inóculo, se descongeló un criovial del banco celular previamente preparado. El criovial se descongeló durante tres minutos a temperatura ambiente para posteriormente transferirlo a 30 mL de medio fresco en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Se incubó a $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 y 130 rpm durante al menos 15 min, después de este tiempo se determinó la concentración y viabilidad celular, teniendo como criterio para este último parámetro un valor $\geq 70\%$.

8.1.4. Cultivos en modo lote

Se realizaron cultivos por triplicado en modo lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de trabajo de 100 mL, mantenidos en una incubadora Innova 4230 (New Brunswick Scientific) a una temperatura de 37 °C y una agitación de 130 rpm. Se establecieron tres condiciones de pCO₂ distintas: 0.03 (0.23), 5 (38), y 20 (152) % (mmHg). Estos niveles fueron controlados en la atmósfera de la incubadora y se verificaron por medio de un indicador de gases Fyrite Classic (Bacharach). Los cultivos realizados a 5% de CO₂ se designaron como cultivos control.

Los matraces fueron inoculados a una concentración celular inicial de 0.5 x 10⁶ cel mL⁻¹, utilizando subcultivos con una viabilidad ≥90% y una concentración celular inferior a 10⁷ cel mL⁻¹. Los matraces se muestrearon cada 24 horas para determinar la concentración y viabilidad celular, así como para la cuantificación de metabolitos (glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio) y de anticuerpo monoclonal. La medición del pH se realizó inmediatamente después de cada muestreo.

8.2. Métodos analíticos

8.2.1. Concentración y viabilidad celular

La concentración celular se determinó utilizando un Coulter Counter Multisizer III (Beckman Coulter) con un tubo de apertura de 100 μm. Las muestras se diluyeron en solución isotónica con la finalidad de evitar variaciones en el tamaño celular por cambios en la osmolaridad. La concentración celular se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$x_T = \frac{N}{0.1} * fd \quad (4)$$

donde x_t es la concentración celular total, N es el número de partículas contadas por el equipo y fd es el factor de dilución.

La viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión con azul de tripano al 20% en buffer PBS. Se utilizó una cámara de Neubauer (Hausser Scientific) y un microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon). Los conteos se realizaron utilizando el objetivo 10x. Las

células no viables y viables se identificaron como aquellas teñidas de azul y sin teñir, respectivamente. La viabilidad celular se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Células viables}}{\text{Células totales}} * 100 \quad (5)$$

8.2.2. Cuantificación de metabolitos

La concentración de metabolitos consumidos (glucosa y glutamina) y producidos (lactato y glutamato) se determinó en el sobrenadante de los cultivos utilizando un multianalizador bioquímico YSI 2950D (YSI Instruments). La producción de amonio se cuantificó utilizando el método modificado del indofenol (Villaseñor, 1998). Este método colorimétrico utiliza una solución A (fenol 0.106 M y nitroprusiato de sodio 0.17 mM) y una solución B (hidróxido de sodio 0.125 N e hipoclorito de sodio 11 mM). La curva de calibración se elaboró utilizando estándares de amonio con las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mM (ver Apéndice 12.1). Las muestras se procesaron añadiendo 500 μ L de solución A y 12.5 μ L de estándar o muestra y agitando en vórtex. Posteriormente, se agregaron 500 μ L de solución B, se volvió a agitar y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego de la incubación, las lecturas de absorbancia se realizaron a 635 nm utilizando un espectrofotómetro BioSpectrometer (Eppendorf), el cual se ajustó a cero con un blanco preparado con 500 μ L de solución A y 500 μ L de solución B.

8.2.3. Cuantificación de anticuerpo monoclonal

El AcM recuperado directamente del caldo de cultivo se cuantificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna MAbPac Protein A (Thermo Scientific) acoplada al sistema Alliance e2796 (Waters) de HPLC. Para la detección y cuantificación, se empleó un detector de matriz de fotodiodos PDA 2998 (Waters) a una longitud de onda de 280 nm.

Se utilizó buffer de fosfato de sodio (pH 7.45) como buffer de unión y equilibrio. Para la elución del AcM se empleó un buffer de ácido fosfórico/fosfato de sodio (pH 2.5). Se utilizó un buffer de fosfato/azida de sodio como buffer de almacenamiento (pH 7.45). Las

condiciones de operación incluyeron un flujo de 1 mL min⁻¹, una presión de 280-300 psi y una temperatura de 25 °C; permitiendo la separación y cuantificación del AcM en el caldo de cultivo (ver Apéndice 12.2).

8.2.4. Cuantificación de actividad enzimática

La actividad enzimática de las glicosidasas: α -manosidasa y β -galactosidasa, se cuantificó por medio de espectrofluorimetría (Gramer & Goochee, 1993). Se procesaron muestras provenientes del caldo de cultivo y de lisados celulares. Las muestras se obtuvieron cada 24 h a partir de 1 mL de cultivo para ambos casos, se centrifugaron a 6021 RCF durante 5 min. El *pellet* formado se utilizó para la cuantificación de actividad intracelular, mientras que la actividad extracelular se midió usando el sobrenadante recuperado.

Para la actividad intracelular el *pellet* celular se lavó dos veces con 1 mL de buffer PBS pH 7.5. Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 μ L de una solución de lisis 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Tritón X-100 y fueron congeladas a -20 °C durante 30 min. Las células se descongelaron, resuspendieron y trataron en un sonicador QSonica Q700 (QSonica Sonicators) en pulsos de 10 s utilizando una amplitud de onda del 60%. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 9408 RCF durante 10 min y se recuperó el sobrenadante para su posterior uso.

La actividad fue determinada mediante reacciones enzimáticas utilizando como sustratos 4-metilumbeliferil β -D-galactopiranosido (Cat. M1633, Sigma) y 4-metilumbeliferil α -D-manopiranosido (Cat M3657, Sigma), para la actividad galactosidasa y manosidasa, respectivamente. Se incubaron 10 μ L de muestra (caldo de cultivo o lisado celular) con 90 μ L de una solución de sustrato 1.0 mM durante 1 h a 37 °C. La reacción se detuvo adicionando 900 μ L de una solución de glicina 0.2 M pH 10.5. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Perkin Elmer Instruments) a una longitud de excitación de 357 nm y una longitud de emisión de 447 nm, con una apertura de 7.5 nm para ambos casos.

La actividad enzimática fue calculada interpolando los valores de fluorescencia de las muestras en una curva estándar de 4-metilumbeliferona en un rango de 1-80 μ M (ver

Apéndice 12.3). La actividad enzimática intracelular fue reportada como nmol de piranósido (galacto o mano) hidrolizado por 10^6 células $^{-1}$ lisadas h^{-1} , mientras que la actividad extracelular se reportó como U/mL donde $1U = \mu\text{moles de piranósido hidrolizado/min}$. Los valores anteriores se normalizaron, de igual forma, a $U \times 10^{-12} \text{ cel}^{-1}$ para todas las actividades determinadas (ver Apéndice 12.4).

8.3. Cálculos cinéticos y estequiométricos

8.3.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó en la fase exponencial de los cultivos, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

Integrando:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu(t - t_0) \quad (7)$$

donde X y X_0 son la concentración de células viables al tiempo t y al inicio del cultivo (t_0), respectivamente. La μ se calculó a través de la regresión lineal obtenida de la gráfica de $\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)$ contra el tiempo durante la fase de crecimiento exponencial.

8.3.2. Determinación del rendimiento de metabolitos

Al igual que μ , los rendimientos de células sobre sustrato ($Y_{X/S}$) y de producción sobre sustrato ($Y_{P/S}$) fueron calculados en la etapa exponencial de los cultivos mediante las siguientes ecuaciones:

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \quad (8)$$

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (9)$$

donde X es la concentración de células viables, S es la concentración de sustrato (glucosa o glutamina) y P es la concentración de producto (lactato, glutamato o AcM).

8.3.3. Determinación de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos

Las tasas específicas de consumo de sustrato y formación de producto, incluyendo el anticuerpo monoclonal, se determinaron de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (10)$$

$$q_P = \mu \cdot Y_{P/X} \quad (11)$$

donde q_S es la tasa específica de consumo de sustrato, q_P es la tasa específica de formación de producto, μ es la velocidad específica de crecimiento, $Y_{X/S}$ es el rendimiento biomasa-sustrato y $Y_{P/X}$ es el rendimiento producto-biomasa. Ambas tasas específicas se obtuvieron con la regresión lineal de la curva de concentración de metabolito contra concentración de células viables durante la fase de crecimiento exponencial.

8.4. Caracterización del anticuerpo monoclonal

8.4.1. Purificación

Para la purificación del AcM se cosechó el medio de cultivo cuando la viabilidad celular alcanzó un valor $\leq 70\%$. El caldo de cultivo se centrifugó a 4984 RCF durante 10 min para la obtención de sobrenadante, el cual se filtró a través de membranas Millipore™ de 0.22 μm para eliminar sólidos suspendidos. El AcM se purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína A, utilizando un volumen de columna de 3 mL de la resina ProSep Ultra Plus Media (Merck). Las condiciones durante la purificación se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Condiciones de purificación del AcM producido.

Paso	Solución	pH	Volumen (mL)
Equilibrio	PBS, NaCl 0.3 M	7.6	30
Carga de muestra 1	–	7.2	90
Carga de muestra 2	–	–	90
Lavado	PBS, NaCl 0.3 M	7.6	30
Elución 1	Glicina 0.1 M	3.0	6
Elución 2	Glicina 0.1 M	–	6
Regeneración	Ácido fosfórico 150 mM	–	30

Después de la segunda elución, se ajustó el pH de los eluidos conteniendo el AcM, a un valor de 7.0-7.2 con una solución de neutralización Tris-base 1 M pH 9.0. El contenido de anticuerpo se cuantificó midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific) y se almacenó a -70 °C para su posterior uso.

8.4.2. Análisis del patrón de N-glicosilación

El patrón de N-glicosilación del AcM producido se analizó mediante cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) en cromatografía líquida *Ultra-Performance* (UPLC) utilizando una columna Acquity UPLC BEH Glycan Amide Column (Waters Corporation). Se desnaturalizaron 100 µg de anticuerpo purificado con una solución de SDS 2%, β-mercaptoetanol 1 M para favorecer la exposición de la cadena polipeptídica y facilitar la liberación de los glicanos.

Los glicanos se liberaron mediante digestión enzimática incubando las muestras con 1 U de PNGasa-F (Calbiochem) durante 15 h a 37 °C. Después de este tiempo se agregó un control interno de maltosa 10 µM y se precipitaron los glicanos por adición de etanol absoluto frío reposando las muestras durante 20 min. Las mezclas de reacción se centrifugaron a 9408 RCF durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y se concentró a sequedad utilizando un concentrador SAVANT Speed Vac (ThermoScientific). Los glicanos ya concentrados se derivatizaron utilizando 2-aminobenzamida (2-AB) e incubando por 2 h a 65 °C en un Thermoblock Thermomixer (Eppendorf). Pasado el tiempo de incubación, los glicanos marcados se enjuagaron mediante filtración con papel

Whatman No. 1 (Cat. 1001-070, Whatman). Los lavados se realizaron agregando 1 mL de agua Mili-Q, 5 mL de ácido acético al 30% y 1 mL de acetonitrilo al 100%, dejando reposar la muestra sobre las membranas por 15 min. Posteriormente, se realizó un enjuague con 100 μ L de acetonitrilo al 100% seguido de 5 mL de acetonitrilo al 96%. Finalmente, los glicanos se eluyeron con 2 mL de agua Mili-Q para su concentración en el equipo SAVANT Speed Vac.

Los glicanos derivatizados y concentrados, se inyectaron al cromatógrafo utilizando una solución de acetonitrilo-formato de amonio como fase móvil. La detección de los glicanos se realizó con un detector de fluorescencia Waters 2475 (Waters Corp.) a longitudes de onda de 330 nm de excitación y 420 nm de emisión. La identificación de las estructuras de los oligosacáridos se realizó con base en su migración en unidades de glucosa (UG), para esto se compararon los tiempos de retención de la muestra con los de un polímero de glucosa (dextrana). Una vez obtenidos los cromatogramas se propusieron estructuras de glicanos correspondientes a su migración en UG (ver Apéndice 12.5).

8.4.3. Análisis de las variantes de carga

Se determinó el perfil de variantes de carga del AcM purificado por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) con gradiente de pH, utilizando una columna Dionex Propack WCX 10 (ThermoScientific) y dos fases móviles: fase A pH 7 y fase B pH 10. Se utilizó un detector de matriz de fotodiodos PDA 2998 (Waters) en un espectro de 210-300 nm, y se determinó el área bajo la curva para cada uno de los picos (especies ácidas, especies principales y especies 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.

8.5. Análisis transcripcional

8.5.1. Selección de genes de interés

Se evaluó el impacto del pCO₂ en los niveles de expresión de seis genes mediante RT-qPCR. Estos genes se encuentran relacionados con el metabolismo celular (*ldhA* y *gls*) (Hartley *et al.*, 2018), la regulación del pH_i y el equilibrio CO₂/HCO₃⁻ (*ca5B*) (Boron, 2010),

así como los genes que codifican las cadenas ligera y pesada del AcM, y las modificaciones postraduccionales, específicamente la formación de variantes de carga (*cpD*) (Hu *et al.*, 2016). Para realizar la normalización de los niveles de expresión se seleccionó a *eif3K* como el gen de referencia de acuerdo con un conjunto de experimentos que comprobaron la estabilidad en la expresión del gen a través de diferentes condiciones de cultivo de células CHO (Bahr *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2020) (Tabla 5).

Tabla 5. Genés de interés propuestos para el análisis de sus niveles de expresión bajos distintos niveles de pCO_2 .

Función	Proteína	Gen	Acceso a Genbank
Metabolismo del piruvato	Lactato deshidrogenasa	<i>ldhA</i>	NM_001244050.1
Glutaminólisis	Glutaminasa	<i>gls</i>	XM_016980260.2
Sistema buffer	Anhidrasa carbónica	<i>ca5B</i>	XM_027383940.2
Modificaciones postraduccionales	Carboxipeptidasa D	<i>cpD</i>	XM_003506091.5
Anticuerpo monoclonal	Cadena pesada (HC)	NA	NA
	Cadena ligera (LC)		
Inicio de la traducción	Factor eucarionte de inicio de la traducción	<i>eif3K</i>	XM_007644386.3

8.5.2. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos correspondientes se diseñaron utilizando el software Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information) sobre las secuencias de ARNm reportadas para el hámster chino (*Cricetulus griseus*) en la base de datos CHOGenome.org, a excepción de las secuencias para las cadenas del AcM, que tienen carácter confidencial. Los parámetros establecidos para el diseño de los oligonucleótidos incluyeron: longitud del oligonucleótido entre 18-22 pb, contenido de GC entre 50-55 %, tamaño de amplicón entre 90-130 pb y T_m óptima de 60.0 °C. Se comprobó que los oligonucleótidos diseñados fueran específicos para los genes de interés por medio de alineamiento utilizando el programa en línea Primer-BLAST (National Center for

Biotechnology Information). Las propiedades de los oligonucleótidos (como formación de homodímeros y heterodímeros, y formación de horquillas) fueron revisados con el programa en línea OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies). Los oligonucleótidos que cumplieron con los parámetros establecidos (Tabla 6) fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Se verificó que los oligonucleótidos seleccionados amplificaran un solo producto del tamaño esperado, mediante una reacción de PCR de punto final y gel de agarosa al 1.5% (ver Apéndice 12.6).

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para el análisis transcripcional.

Gen	Proteína		Secuencias de oligonucleótidos (5' – 3')	%Ef
ldhA	Lactato deshidrogenasa A	F	GGA GCA GTG GAA TGA GGT TCA	87.24
		R	GTC AGC CAC AGA CAG ACC AAT	
gls	Glutaminasa	F	CGT TGG CTA ATG GCG GTT TC	94.89
		R	ACC GAC ATG GAA GGC AAA CT	
ca5B	Anhidrasa carbónica 5B	F	CAA GAA GCA GCC AGT AGA GGT T	98.05
		R	GGC GGA AGT TGT CCA CCA TT	
cpD	Carboxipeptidasa D	F	GCC AAG GGA ACT CGT GGT AA	97.68
		R	AGC CGA TGG AAG CCA TCT TT	
N/A	Cadena pesada	F	AGG ACT GGC TCA ACG GAA AG	96.21
		R	CCT TTG GCC TTC GAG ATC GT	
N/A	Cadena ligera	F	GAG CAG GAC TCG AAG GAC AG	94.02
		R	ACC TTG TGC TTC TCG TAG TCG	
EIF3K	Factor de inicio de la traducción 3K	F	CTG ACG AGT CAG GGC AGA TT	95.15
		R	GTT ATT GGG AGG AGG CCA TGA T	

N/A = No aplica; F = *forward*; R = *reverse*; %Ef = eficiencia de amplificación de la reacción

8.5.3. Extracción, limpieza, cuantificación y verificación de la integridad del ARN total y síntesis de ADN complementario

A partir de 2×10^6 células totales colectadas a las 48 y 120 h de cultivo, se extrajo ARN total utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen). El ARN total aislado se cuantificó utilizando un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) y se procedió a su limpieza de ADN genómico

(ADNg) utilizando el kit TURBO DNA-free (Invitrogen). En ambos casos, se siguieron los protocolos del fabricante.

Se cuantificó la concentración del ARN total limpio con un NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific). Se verificó su integridad por medio de las relaciones 260/280 y 260/230; y se cargaron 5 µg de ARN en gel de agarosa al 1.2% (ver Apéndice 12.7).

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 5 µg de ARN total purificado, utilizando una mezcla de oligonucleótidos poli(dT)₁₈ y hexámeros aleatorios del kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizaron dos tipos reacciones de retrotranscripción, con (RT+) y sin (RT-) la enzima transcriptasa reversa, con el objetivo de verificar la ausencia de contaminantes en los pasos posteriores (corroborando la señal en las reacciones de RT-PCR). Se obtuvieron 20 µL de ADN complementario para cada una de las condiciones a evaluar.

8.5.4. Amplificación de ADN complementario por medio de RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron utilizando el ADN complementario previamente sintetizado como templado. Se utilizó el kit *Power-SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y para la amplificación y detección de los productos en tiempo real se empleó el equipo QuantStudio5 (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en placas MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) con un volumen total de 10 µL. Cada reacción empleó 1 µL de ADN complementario, 150 nM de oligonucleótidos sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) específicos para cada uno de los genes y 5 µL de la mezcla *Power-SYBR Green*. El volumen faltante se completó con agua grado biología molecular. Se emplearon controles sin templado (NTC) para la detección de cualquier contaminación presente en los reactivos, RT- para la detección de contaminación por ADN genómico, y las reacciones completas (RT+) con todos los reactivos. Además, se obtuvieron las curvas de disociación para todos los genes con la finalidad de detectar productos inespecíficos (ver Apéndice 12.8). Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 7:

Tabla 7. Condiciones de amplificación para las reacciones de RT-qPCR

Etapa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
Retención	Activación de la Taq ADN polimerasa	95	10 min
	Amplificación (40 ciclos)	Desnaturalización	95
Curva de disociación	Alineamiento/Extensión	60	1 min
	Desnaturalización	95	15 s
	Alineamiento	60	15 s
	Desnaturalización	95	15 s

Para cada uno de los genes se realizó una curva estándar con distintas cantidades de templado para la obtención de la eficiencia de la reacción (ver Apéndice 12.8). Para la elaboración de las curvas estándar, se realizaron diluciones seriales 1:5 a partir de 1 µL del ADN complementario sintetizado para obtener al menos 4 puntos por cada gen. La amplificación se realizó utilizando las condiciones previamente mencionadas. La eficiencia de reacción se obtuvo mediante la siguiente ecuación (Rasmussen, 2001):

$$\% \text{ eficiencia} = \left\{ \left[10^{(-1/\text{pendiente})} \right] - 1 \right\} \times 100 \quad (12)$$

donde la pendiente se obtuvo al graficar el logaritmo de la concentración de ADNc contra el ciclo umbral (Ct).

Los cambios en los niveles de expresión se determinaron por el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001) mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{GOI} - Ct_{HK})^{muestra} - (Ct_{GOI} - Ct_{HK})^{control} \quad (13)$$

donde Ct_{GOI} es el ciclo umbral del gen de interés y Ct_{HK} es el ciclo umbral del gen de referencia (*housekeeping*). La condición control respecto a la que se normalizaron los niveles de expresión fue 5% de pCO₂ a las 48 horas, utilizando a *eif3K* como gen de referencia.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Cultivos a diferentes condiciones de pCO₂

Se realizaron cultivos de células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal por triplicado utilizando las condiciones de 0.03 (0.23), 5 (38), y 20 (152) % (mmHg) de pCO₂. La condición de 5% (38 mmHg) de pCO₂ fue tomada como condición control para futuras referencias. Este criterio es debido a que el sistema cuenta con un buffer de bicarbonato se necesita CO₂ para poder regular el pH del cultivo. Los valores de pCO₂ se refieren al valor presente en la atmósfera de la incubadora, confirmado por medición con firta.

Para la condición control se observa un crecimiento exponencial en el periodo de 48-96 h de cultivo, este comportamiento se observa hasta las 144 h para los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂; mientras que para la condición a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ no fue posible apreciar alguna fase de crecimiento exponencial durante el tiempo que duró el cultivo. Los cultivos realizados a 5 (38 mmHg) y 20% (152 mmHg) de pCO₂ alcanzaron concentraciones celulares máximas similares entre sí, 10.50 y 11.06 x10⁶ célula mL⁻¹, respectivamente. En contraste, los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂, presentaron las concentraciones celulares más bajas, 1.69x10⁶ célula mL⁻¹; y detuvieron su crecimiento 48 horas antes respecto a la condición control (ver Figura 8).

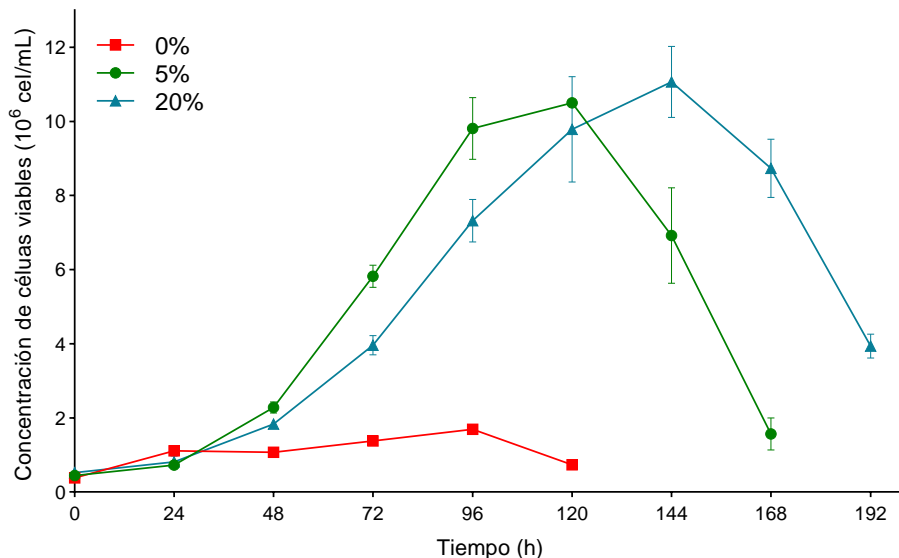


Figura 8. Cinética de crecimiento de células CHO productoras de AcM. Se evaluaron tres condiciones distintas de pCO₂: 0.03% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul). Los cultivos realizados a 5% de pCO₂ se establecieron como cultivos control.

Efectos similares han sido reportados, donde mayores niveles de CO₂ no parecen afectar la concentración de células viables en el cultivo. Takuma *et al.* (2007), reportaron concentraciones similares a los seis días de cultivos en lote para 5% (38 mmHg) y 20% (152 mmHg) de pCO₂ de aproximadamente 2x10⁶ células mL⁻¹. Darja *et al.* (2016) no observaron un impacto al incrementar de 10% (76 mmHg) a 20% (152 mmHg) el CO₂ a 37 °C, mientras que, al decrecer la temperatura a 33 °C, 20% (152 mmHg) de pCO₂ parece impactar la concentración celular al pasar de 4x10⁶ a 0.5x10⁶ células mL⁻¹. En ambos casos, los cultivos se realizaron controlando la pCO₂ dentro de la incubadora. En cultivos realizados en biorreactor de 2 L, se reportó esta misma tendencia, al incrementar pCO₂ de 58 mmHg (7.6%) a 148 mmHg (19.5 %) la concentración celular disminuyó en menos de 10% (Zhu *et al.*, 2005).

En otros sistemas se ha visto el efecto contrario al que se observó en este estudio. En cultivos en perfusión realizados en biorreactores de 10 L, la concentración celular decreció de 8.9 a 5.9 x10⁶ células viables mL⁻¹ (Gray *et al.*, 1996) conforme la pCO₂ incrementaba de 35 mmHg (4.6%) a 148 mmHg (19.5%). En tanto que en cultivos en lote realizados en biorreactores de 3 L se observó un impacto negativo en el crecimiento celular a 20% (152 mmHg) de pCO₂ y en tres valores de pH distintos (6.8, 7.0 y 7.2) con respecto a los cultivos realizados a 5% (38 mmHg) y 12.5% (95 mmHg) de pCO₂ (Brunner *et al.*, 2017). Los diferentes sistemas utilizados darían origen a las diferencias observadas en estos experimentos. La transferencia de masa y, en este caso, la solubilización del CO₂, se rigen por diversas variables acorde con el sistema utilizado (Maier & Büchs, 2001; Sieblist *et al.*, 2011; Veglio *et al.*, 1998).

De igual manera, se han realizado experimentos en los que se han utilizado niveles de pCO₂ por debajo del 5% (38 mmHg) para evaluar su impacto en cultivos celulares. Comportamientos similares a los del presente trabajo se obtuvieron para cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ en la atmósfera de una incubadora. En estos trabajos, las células comprometieron su crecimiento, alcanzando concentraciones bajas y deteniendo su crecimiento tiempo antes en comparación con los cultivos control a 5% (38 mmHg) de pCO₂ (Gray *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 2001).

El CO₂ es una molécula intermediaria en el metabolismo central del carbono (glicólisis y ciclo del TCA). Interviniendo en diversas reacciones de carboxilación-descarboxilación, donde tanto el CO₂ como el HCO₃⁻ pueden ser asimilados y/o liberados (Blombach & Takors, 2015). La condición con 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂, comprometería las reacciones anapleróticas al principio de los cultivos, de manera que la conversión de fosfoenolpiruvato a oxalacetato, y viceversa, se vería comprometida por la falta de CO₂/HCO₃⁻. De esta manera, se limitaría la formación de precursores biosintéticos a partir de intermediarios en la glicolisis (piruvato) o en el ciclo del TCA (malato, oxalacetato y α-cetoglutarato) (Brunengraber & Roe, 2006; Erb, 2011; Head & Venditti, 2023), inhibiendo el crecimiento celular. En contraste, en condiciones de 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂ esta limitación no se presentaría y el crecimiento celular se daría de forma normal (Blombach & Takors, 2015).

En la Figura 9 se muestra la viabilidad celular para las tres condiciones establecidas. Se observa una viabilidad por arriba del 90% para las tres condiciones durante las primeras 96 h de cultivo, posteriormente el comportamiento de este parámetro comienza a variar para cada una de las condiciones. A partir de las 120 h se da una disminución drástica en la viabilidad para los cultivos a 5% (38 mmHg) de pCO₂, llegando a un valor de 76 y 30% a las 144 y 168 h, respectivamente. Respecto a los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) se observa una disminución de la viabilidad más rápida, llegando a un valor cercano al 50% a las 120 h de cultivo. Por otro lado, al incrementar la pCO₂ a 20% (152 mmHg) la viabilidad no se afectó, manteniéndose por arriba del 90% hasta las 144 h, a partir de este punto la viabilidad decrece hasta aproximadamente 80% a las 168 h para que finalmente disminuya a un valor de aproximadamente 50%.

Durante las primeras 72 h no se presentaron cambios en las viabilidades para las condiciones evaluadas en el presente trabajo. Resultados similares fueron obtenidos en cultivos realizados a dos temperaturas: 33 y 37 °C; y dos niveles de pCO₂: 10 y 20% (76 y 152 mmHg); en las cuatro condiciones evaluadas, la viabilidad se mantuvo constante con valores del 95-98% (Darja *et al.*, 2016). En cultivos realizados en biorreactores de 2 L, la viabilidad no se vio afectada al incrementar la pCO₂ de 58 a 148 mmHg (7.6 a 19.5%) cuando la osmolalidad se mantuvo estable (310-370 mOsm kg⁻¹). Sin embargo, este

parámetro se vio afectado al incrementar tanto la $p\text{CO}_2$ como la osmolalidad, confirmando que la $p\text{CO}_2$ ejerce mayor efecto en conjunto con la osmolalidad del cultivo (Zhu *et al.*, 2005). En contraste con los resultados obtenidos, en cultivos a mayor escala (10 L), la viabilidad decreció un 21% al incrementar la $p\text{CO}_2$ de 35 a 148 mmHg (4.6 a 19.5%) (Gray *et al.*, 1996).

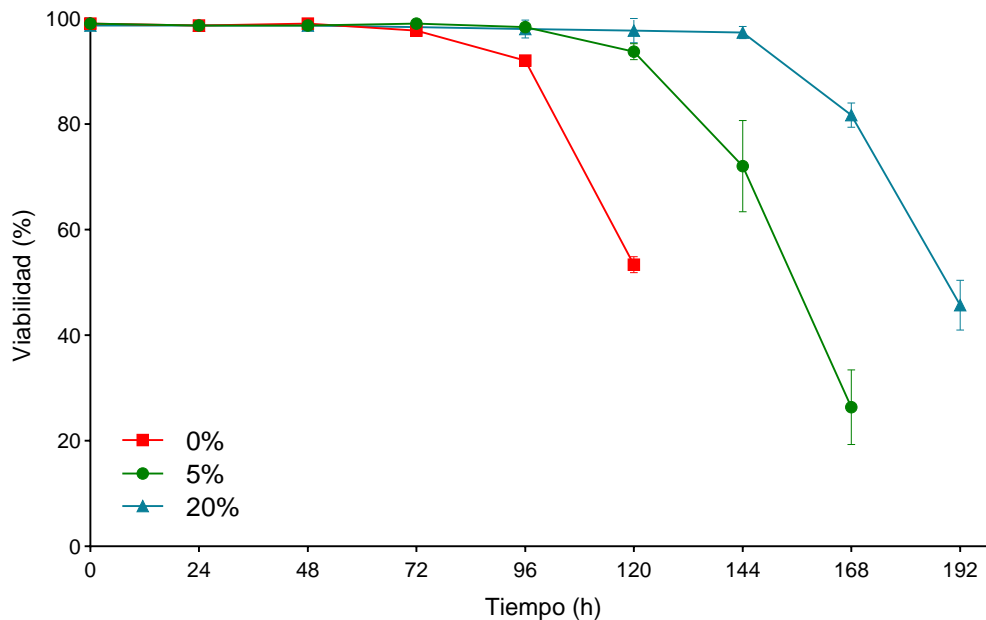


Figura 9. Viabilidad celular de células CHO productoras de AcM. Se evaluaron tres condiciones distintas de $p\text{CO}_2$: 0.03% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul).

En este trabajo, los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de $p\text{CO}_2$ fueron los que tuvieron una disminución de la viabilidad más rápida. Además, los cultivos en esta condición mostraron valores más bajos de pH, con un mínimo de 6.8, en comparación con las otras dos condiciones (ver Figura 10). Este descenso en el pH posiblemente se debió a la acumulación de lactato en el medio (ver Figura 13). Contrario a los resultados obtenidos, Brunner *et al.* (2017), reportaron que cultivos mantenidos a pH 6.8 presentaron viabilidades estables a lo largo del tiempo de cultivo independientemente del valor de $p\text{CO}_2$ utilizado, mientras que los cultivos mantenidos a pH 7.2 la viabilidad decayó más rápidamente para las tres condiciones de $p\text{CO}_2$ evaluadas

La disminución en la viabilidad puede originarse por la disminución de la tasa de proliferación o inducción de la muerte celular (Özkaya & Geyik, 2022). Uno de los mecanismos mediante el cual puede inducirse la muerte celular es la apoptosis (Galluzzi

et al., 2018). Se ha reportado que niveles bajos de pH (acidosis) pueden inducir la apoptosis mediante diversos mecanismos (Dong et al., 2018; Lagadic-Gossmann et al., 2004; Zhang et al., 2017). Una posible explicación para la caída drástica en la viabilidad de los cultivos a 0.03% de pCO₂ sería la disminución del pH que se presentó para esta condición debido a la acumulación de lactato en el medio, que pudo haber activado algún mecanismo apoptótico. En contraste, el pH en las condiciones de 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂ se mantuvo más estable, por lo que el crecimiento sucedió de manera normal.

Los cambios en el pH fueron monitoreados para cada una de las condiciones evaluadas (ver Figura 10). Los cultivos control, que iniciaron a un pH 7.4, presentaron el pH más bajo a las 72 h (6.98), a partir de este punto comenzó a incrementar hasta llegar a un valor de 7.53 al final del cultivo. Contrario a lo esperado, donde niveles elevados de CO₂ conllevarían a la disminución del pH, en el presente trabajo los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂ mantuvieron de manera más constante el pH a lo largo del cultivo. El punto mínimo para esta condición se presentó a las 120 h, disminuyendo de 7.40 a 7.18. Posterior a este tiempo, el pH incrementó hasta alcanzar un valor de 7.51 al final del cultivo. Tal como se explica más adelante, en ambos casos se observa una correlación de estos decrementos e incrementos en los valores del pH con la producción y el consumo de lactato por parte de las células

Por otra parte, en los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ se presentó el valor más bajo de pH de entre todas las condiciones evaluadas. Durante las primeras 24 h se observó un incremento en el pH, para comenzar a decrecer y alcanzar un valor mínimo de 6.83 a las 72 h de cultivo. Este mismo comportamiento fue reportado por Yoon *et al.* (2001) en cultivos realizados a niveles de pCO₂ por debajo del 5% (38 mmHg), en donde en todas las condiciones evaluadas (0.03, 0.5, 1 y 3% de pCO₂) se observó un incremento inicial en las primeras 24 h para posteriormente disminuir. Una posible causa sería el alto flujo glicolítico que conllevaría a la producción de lactato, debido a la falta de intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), y que provocaría el descenso en el pH del medio.

En las condiciones evaluadas las variaciones en el pH del medio se correlacionan con la producción y consumo de lactato. Este metabolito puede ser excretado o internalizado por las células a través de proteínas cotransportadoras de H⁺-monocarboxilatos. La actividad de estas proteínas se encuentra controlada por los gradientes de lactato y H⁺ a través de la membrana celular (Hartley *et al.*, 2018; Poole & Halestrap, 1993). Se ha reportado que distintas líneas celulares pueden hacer frente a bajos niveles de pH extracelular incrementando el número de transportadores de protones en la membrana plasmática, o cambiando la afinidad del sustrato de los transportadores sin incrementar el número de estos (Owen *et al.*, 1997).

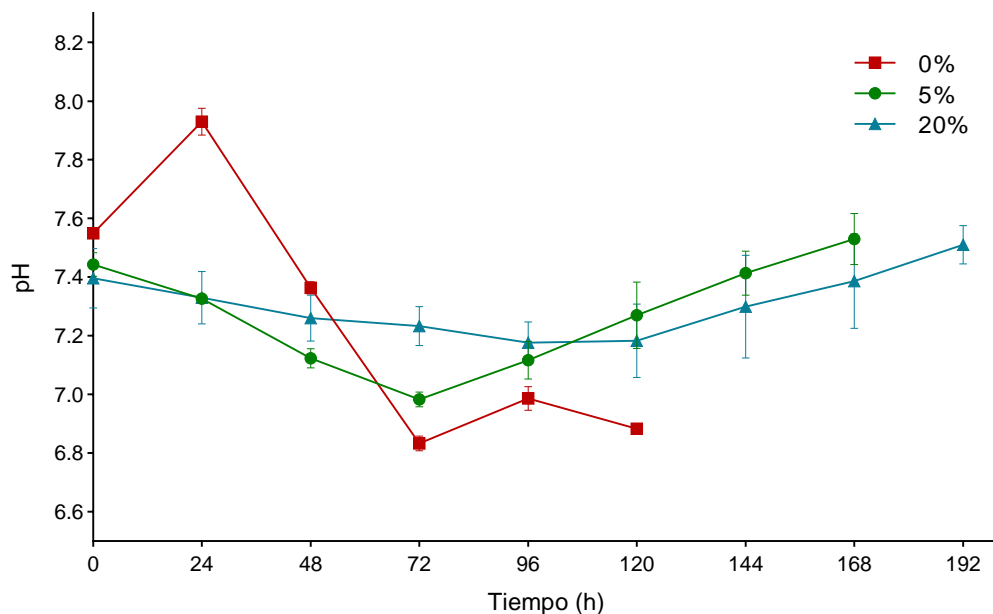


Figura 10. Variación del pH en cultivos de células CHO productoras de AcM. Se midió el comportamiento a lo largo de los cultivos a distintas condiciones de CO₂ atmosférico: 0% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul).

Respecto al AcM (ver Figura 11), la mayor producción se observó en los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂, donde la concentración máxima de proteína recombinante fue de 0.397 mg mL⁻¹ a las 192 h de cultivo, mientras que en los cultivos a 5% (38 mmHg) y 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂, fue de 0.225 y 0.037 mg mL⁻¹, respectivamente. Esta misma tendencia se observó al comparar las productividades específicas del AcM (ver Tabla 8). En comparación con la condición control, se observó un incremento del 28% en la q_P al aumentar la pCO₂ de 5% (38 mmHg) a 20% (152 mmHg), mientras que a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ este parámetro disminuyó en un 77%.

Diversos resultados se han obtenido al evaluar condiciones de alto o bajo pCO₂. Contrario a los resultados obtenidos en este trabajo, Gray *et al.* (1996) reportaron una disminución del 44% en la productividad específica de un antígeno viral, al incrementar pCO₂ de 35 a 148 mmHg (4.6 a 19.5%), mientras que en cultivos con osmolalidad constante, q_{tPA} disminuyó un 38% al incrementar de 36 a 250 mmHg (4.7 a 32.9%) la pCO₂ (Kimura & Miller, 1996). Yoon *et al.* (2001) observaron un incremento en la producción específica de EPO al disminuir la pCO₂ de 5 a 0.03% (38 a 0.23 mmHg), en contraste con los valores obtenidos en el presente trabajo, donde los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ presentaron una menor q_P (0.15 ± 0.013 pg célula⁻¹ h⁻¹) en comparación con los cultivos control (5%, 38mmHg) (0.67 ± 0.069 pg célula⁻¹ h⁻¹). En cultivos en lote, la productividad específica de un anticuerpo no mostró diferencias al incrementar pCO₂ de 5 a 20% (38 a 152 mmHg). Sin embargo, al incrementar a 40% (304 mmHg), la productividad específica disminuyó en 28% respecto a los cultivos a 5% (38 mmHg) de pCO₂ (Takuma *et al.*, 2007). Por otro lado, Brunner *et al.* (2017) reportaron que cultivos con valores altos de pH presentaron mayores productividades de un anticuerpo monoclonal. Esta misma tendencia se observó en los resultados obtenidos en este trabajo, donde los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂ y con menores variaciones en el pH a lo largo del cultivo presentaron una mayor q_P (0.86 ± 0.134 pg célula⁻¹ h⁻¹), mientras que los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ presentaron tanto bajos niveles de pH como una menor q_P.

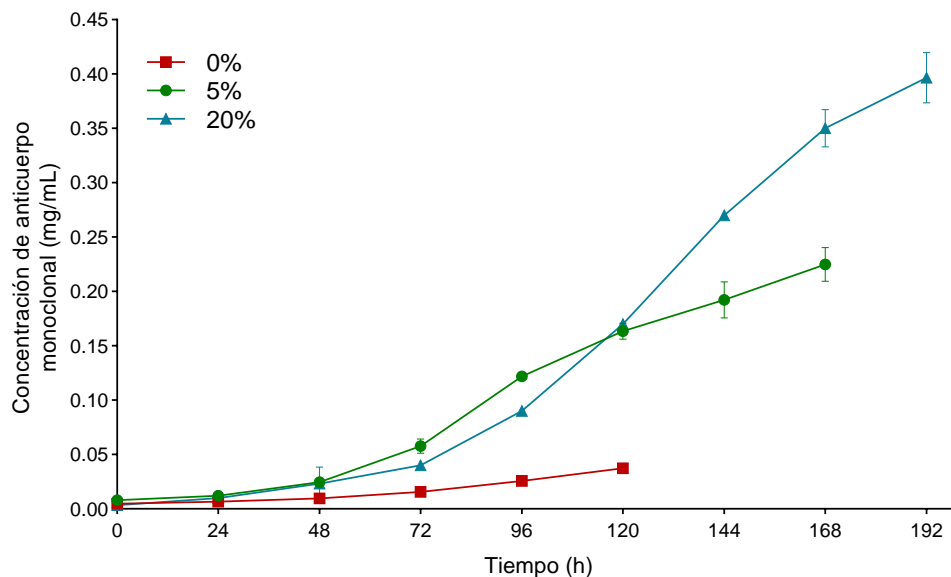


Figura 11. Concentración de AcM por células CHO a distintos niveles de pCO₂. El AcM se cuantificó mediante cromatografía de afinidad acoplada a HPLC. Condiciones de CO₂ atmosférico: 0.03% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul).

Con base en los efectos reportados del CO₂, se han propuesto diversas estrategias para mejorar la productividad de proteínas recombinantes, entre las que se encuentran la eliminación del uso de base (Becker *et al.*, 2019), el uso de bajas concentraciones de CO₂ (Schellenberg *et al.*, 2022; Yoon *et al.*, 2001), cambios en la temperatura en combinación con distintos niveles de pCO₂ (Darja *et al.*, 2016), mejor remoción de CO₂ (Ahleboot *et al.*, 2021; Mostafa & Gu, 2003), entre otras.

9.2. Efecto de la pCO₂ en el metabolismo celular

El efecto del CO₂ en el metabolismo celular se evaluó mediante la cuantificación de los metabolitos (glucosa, glutamina, lactato, glutamato y amonio); así como la determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos. En la Figura 12 se muestra el perfil de la concentración de glucosa en las tres condiciones evaluadas. Es posible observar que los cultivos a 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂ consumieron en su totalidad la glucosa, mientras que los cultivos 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ terminaron con una concentración de 13.76 mM a las 120 h de cultivo. Al comparar las tasas de consumo específico de glucosa (q_{Glc}) se observa que, de las tres condiciones, los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂ presentaron la tasa más baja de consumo (0.08 ± 0.011 pmol célula⁻¹ h⁻¹) mientras que las otras dos condiciones no presentaron diferencias entre sí (ver Tabla 8). No obstante, a pesar de que los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ presentaron un alto consumo de glucosa este no se vio reflejado en la generación de biomasa o producción de anticuerpo. Esta disminución en el consumo de glucosa reduciría a su vez el flujo en glicólisis, por lo que no habría formación de un cuello de botella que impidiera el correcto uso de los metabolitos como la glucosa y glutamina.

En contraste, Yoon *et al.* (2001) observaron un incremento en q_{Glc} al disminuir el suministro de CO₂, incrementando de 0.18 a 0.25 $\mu\text{mol } 10^6 \text{ células}^{-1} \text{ h}^{-1}$ al pasar de 5 a 0.03% (38 a 0.23 mmHg) de pCO₂. Por otro lado, Takuma *et al.* (2007) no encontraron diferencias significativas en el valor de q_{Glc} al incrementar la pCO₂ de 5 a 20% (38 a 152 mmHg). Sin embargo, al incrementar a 40% (304 mmHg) de pCO₂, q_{Glc} disminuyó de 196 a 66 $\text{nmol } 10^6 \text{ células}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

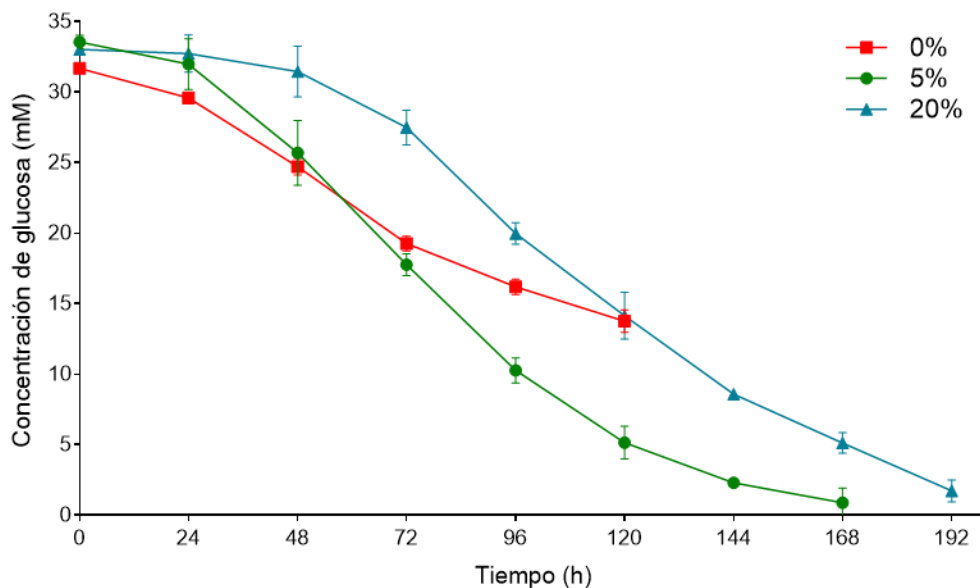


Figura 12. Concentración de glucosa por células CHO productoras de AcM. La concentración de glucosa se cuantificó a lo largo de los cultivos a distintas condiciones de pCO₂ atmosférico: 0.03% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul).

Por otro lado, es posible apreciar dos comportamientos metabólicos para el lactato: producción y consumo (ver Figura 13). En los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ se observa una producción durante todo el cultivo, alcanzando una concentración máxima de 26.93 mM. En estos cultivos no se observó el cambio metabólico de producción a consumo de este metabolito, mientras que tanto en la condición control como a 20% (152 mmHg) de pCO₂, se observa de manera marcada el inicio del consumo de lactato a las 72 y 96 h, para la condición de 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂, respectivamente. En ambas condiciones, el consumo de lactato comenzó cuando la glutamina había sido consumida en su totalidad independientemente de la concentración de glucosa presente en esos momentos (ver Figura 12, 14). Además, es posible apreciar que este cambio metabólico se presentó 24 h más tarde a 20% (152 mmHg) de pCO₂ en comparación con la condición a 5% (38 mmHg) de pCO₂. En ambos casos, la concentración de lactato máxima que se alcanzó fue menor en comparación con los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂. Para esta última condición, el efecto de la concentración de lactato en el pH del medio comenzó a reflejarse a las 24 h de cultivo (ver Figura 10), momento donde el pH comenzó a decrecer. Las máximas concentraciones de lactato se observaron a las 96 y 120 h de cultivo, no obstante, se presentó una fluctuación en el pH probablemente debida a la liberación de distintos componentes por lisis celular, que pudieron haber intervenido

en el equilibrio ácido-base. Esta lisis se detectó mediante la observación al microscopio, donde fue posible distinguir restos celulares conforme la viabilidad iba disminuyendo.

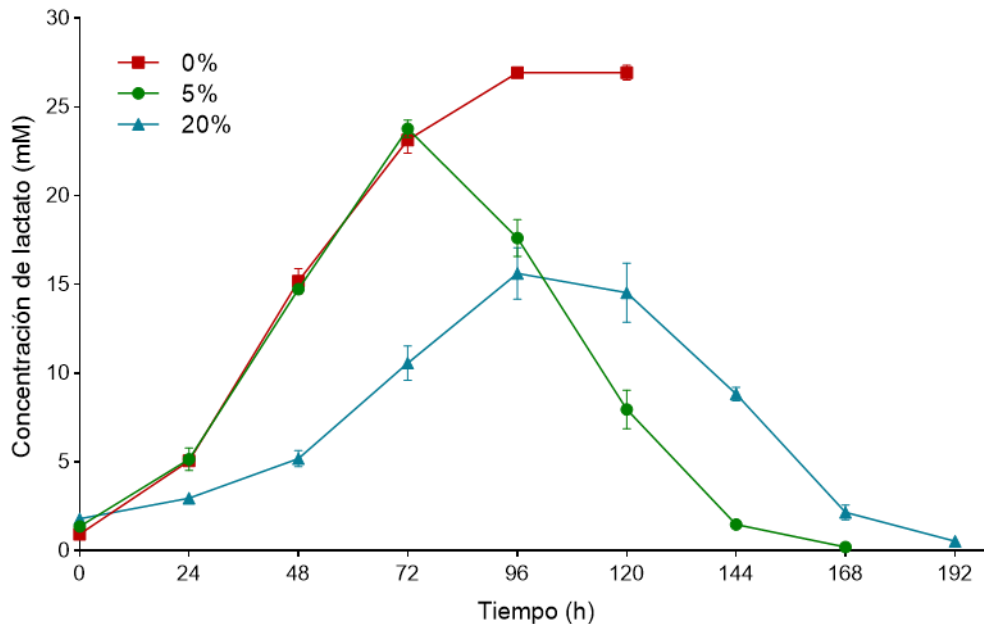


Figura 13. Concentración de lactato en cultivos de células CHO productoras de AcM. Se cuantificó la producción y el consumo de lactato en distintas condiciones de pCO₂ atmosférico: 0% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul).

En cuanto a las tasas de producción específicas de lactato (q_{Lac}), tanto la condición control como a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ presentaron las tasas más altas, 0.19 ± 0.016 y 0.18 ± 0.018 pmol célula⁻¹ h⁻¹ (ver Tabla 8). En contraste, para los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂ se obtuvo la menor tasa de producción de lactato (0.07 ± 0.009 pmol célula⁻¹ h⁻¹). Contrario a los resultados obtenidos en este trabajo, Takuma *et al.* (2007) no reportaron diferencias para q_{Lac} en cultivos en modo lote entre la condición a 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂ (262 y 265 nmol 10⁶ células⁻¹ h⁻¹, respectivamente), mientras que al incrementar a 40% (304 mmHg) de pCO₂, q_{Lac} decreció en más del 50% (113 nmol 10⁶ células⁻¹ h⁻¹). Darja *et al.* (2016) reportaron ligeros decrementos en q_{Lac} para los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂ respecto a la condición control (10%, 76 mmHg de pCO₂), independientemente de la temperatura de cultivo (33 o 37 °C), para las tres líneas celulares estudiadas.

Se ha reportado que niveles elevados de pCO₂ pueden afectar el cambio de producción a consumo de lactato. Por ejemplo, Brunner *et al.* (2018) reportaron que cultivos en lote

realizados a 20% (152 mmHg) de pCO₂ no comenzaron a consumir el lactato hasta que tanto la glucosa como la glutamina fueron consumidos en su totalidad, mientras que aquellos cultivos a 12.5% (95 mmHg) de pCO₂, consumieron el lactato después de haber consumido por completo la glutamina. Este último comportamiento se observó en el presente estudio para los cultivos realizados a 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂, mientras que los cultivos a 0% (0.23 mmHg) de pCO₂ no mostraron este cambio a consumo de lactato (ver Figura 13,14).

Las células CHO se caracterizan por tener altos flujos glicolíticos y de formación de lactato aún en presencia de oxígeno, con la finalidad de regenerar el NAD⁺ para mantener un flujo glicolítico constante y poder proliferar, fenómeno conocido como efecto Warburg (Bulté *et al.*, 2020; Vander Heiden *et al.*, 2009). No obstante, también son capaces de metabolizarlo a través de mecanismos como la formación de gradientes de H⁺ y lactato que dirigen el flujo hacia el interior o exterior de la célula a través de proteínas transportadoras de monocarboxilatos, o el balance en el estado redox celular (Hartley *et al.*, 2018; Mathupala *et al.*, 2007).

Los cultivos realizados a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ mostraron mayores tasas de consumo de glucosa y de producción de lactato. Al haber una mayor actividad glicolítica, la concentración de NADH incrementaría por lo que la producción de lactato de igual forma incrementaría para compensar este desbalance en el estado redox celular (Y. Yang & Sauve, 2016). No obstante, las altas cantidades de lactato producidas y el consecuente decremento del pH del medio impedirían el crecimiento celular debido alteraciones en la maquinaria y en el estado redox celular (Flinck *et al.*, 2018; Fu *et al.*, 2016; Quinn *et al.*, 2020).

Por otro lado, en las condiciones a 5 y 20% pCO₂ el pH se mantuvo más estable a lo largo de los cultivos. Sin embargo, se ha visto que el consumo del lactato es dependiente del pH extracelular como mecanismo para la regulación del pH_i (Liste-Calleja *et al.*, 2015; Román *et al.*, 2018). Además, la ausencia de glutamina en el medio puede inducir de igual forma el cambio al consumo de lactato, debido a la disminución en la concentración de piruvato que es reabastecida mediante la catálisis del lactato (Hartley *et al.*, 2018; Yoo *et al.*, 2020).

La glutamina puede ser utilizada por las células como fuente de nitrógeno para la síntesis de nucleótidos o de aminoácidos, y como fuente alternativa de carbono, reabasteciendo el ciclo del TCA de intermediarios (DeBerardinis *et al.*, 2007). La glutamina es hidrolizada a glutamato, el cual a su vez es convertido a alfa-cetoglutarato para su posterior ingreso al ciclo del TCA, proceso metabólico conocido como glutaminólisis (L. Yang *et al.*, 2017).

En las Figuras 14 y 15, se presentan la evolución de las concentraciones de glutamina y glutamato, respectivamente. Se observa que los cultivos a 0 y 5% (0.23 y 38 mmHg) de pCO₂ consumieron la glutamina 24 h antes que la condición a 20% (152 mmHg) de pCO₂. Este consumo marcó el inicio del consumo de lactato para los cultivos a 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂. De acuerdo con la velocidad específica de consumo de glutamina (q_{Gln}), el consumo más rápido de este aminoácido se dio en la condición a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ (0.05 ± 0.005 pmol célula⁻¹ h⁻¹), mientras que las otras dos condiciones presentaron velocidades de consumo similares entre sí, 0.03 ± 0.006 y 0.02 ± 0.001 pmol célula⁻¹ h⁻¹, para la condición de 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂ respectivamente.

En cultivos en perfusión, no se reportaron efectos significativos de la concentración de glucosa o el nivel de CO₂ utilizado en la q_{Gln} (Takuma *et al.*, 2007), mientras que Darja *et al.* (2016) observaron un mayor efecto del CO₂ en la q_{Gln} a temperaturas bajas (33 °C), en comparación con los cultivos a 37 °C.

Por otro lado, los cultivos a 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂ comenzaron a consumir el glutamato producido a las 72 h de cultivo en ambos casos, mientras que los cultivos sin suministro de CO₂ no presentaron este comportamiento, manteniendo la concentración de glutamato relativamente estable a lo largo del cultivo. Si bien, el glutamato puede ser metabolizado para reabastecer intermediarios al ciclo del TCA, se ha visto que este comportamiento se presenta en la fase de crecimiento celular en presencia de glutamina (Wahrheit *et al.*, 2013). No obstante, el glutamato puede ser utilizado para la síntesis de glutatión (Amores-Sánchez & Medina, 1999; Yoo *et al.*, 2020), el cual actúa como antioxidante durante la fase de producción de proteínas recombinantes (Pereira *et al.*, 2018; Templeton *et al.*, 2013). Además, tanto el lactato como la glutamina pueden contribuir al mantenimiento del estado redox celular a través del equilibrio de NADPH/NADP⁺ y GSH/GSSG (Ying *et al.*, 2021). (Ying *et al.*, 2021). El

incremento en la producción de anticuerpos recombinantes se asocia con un aumento en el estrés oxidativo celular (Templeton et al., 2013). En los cultivos con un 5 y 20% (38 y 152 mmHg) de pCO₂, se observó una mayor producción de anticuerpos monoclonales en comparación con los cultivos que estuvieron con 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂, por lo que el glutamato consumido podría utilizarse para mantener el equilibrio redox durante la fase de producción en estas condiciones.

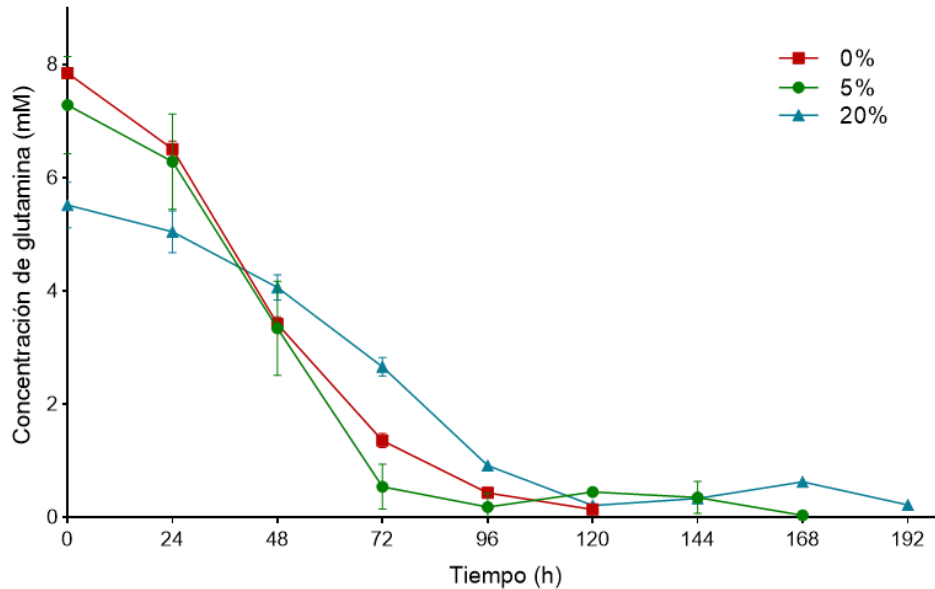


Figura 14. Concentración de glutamina en cultivos de células CHO productoras de AcM. Se cuantificó el consumo de glutamina en distintas condiciones de pCO₂ atmosférico: 0% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul).

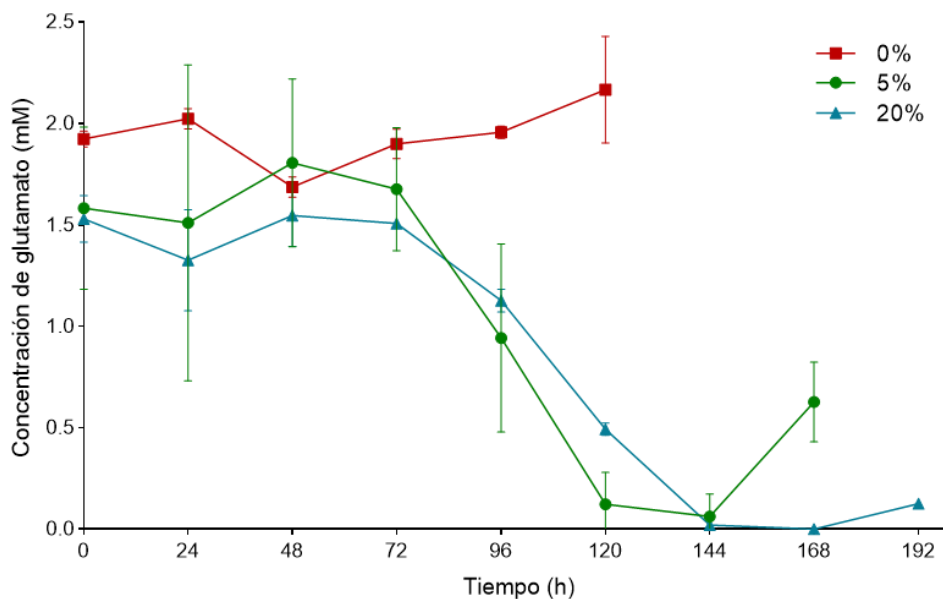


Figura 15. Concentración de glutamato en cultivos de células CHO productoras de AcM. Se cuantificó la producción de glutamato en distintas condiciones de CO₂ atmosférico: 0% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul).

El amonio es un metabolito que es liberado a partir de la conversión de glutamina a glutamato, y la subsecuente conversión de glutamato a α -cetoglutarato en la glutaminólisis (Yoo *et al.*, 2020). Diversos efectos han sido atribuidos al amonio en los cultivos celulares, incluyendo la inhibición del crecimiento celular, alteraciones a nivel metabólico; además de afectar la producción y procesamiento de proteínas recombinantes (Pereira *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 1996), debido principalmente a perturbaciones de los gradientes electroquímicos (Martinelle & Häggström, 1993).

De las tres condiciones evaluadas, los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂ fueron los que produjeron una mayor cantidad de amonio, mientras que los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ produjeron menores cantidades de este ion (ver Figura 16). En los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂, se alcanzaron concentraciones de amonio mayores a 13 mM. Sin embargo, no se observaron efectos negativos en el crecimiento o producción de anticuerpo, a pesar de que a concentraciones mayores a 8 mM el amonio puede tener efectos perjudiciales en cultivos de células CHO (Schneider *et al.*, 1996). Esta alta producción de amonio a 20% (152 mmHg) de pCO₂ contendría con la acidificación del medio debido a la producción de lactato, lo que mantendría estable el pH del medio. Mientras que los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) pCO₂, terminarían por acidificarse debido a que las cantidades de amonio producidas no serían suficientes para equilibrar el pH de los cultivos, esto en adición a la acumulación de lactato descrita anteriormente.

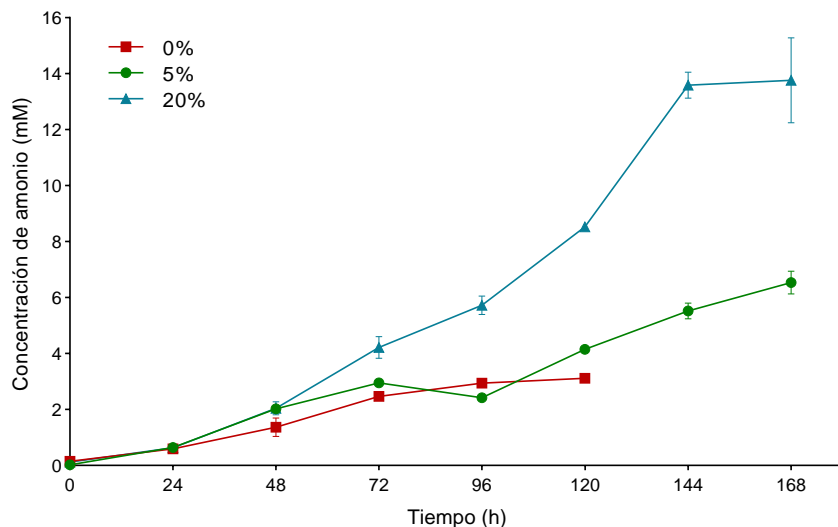


Figura 16. Concentración de amonio en cultivos de células CHO productoras de AcM. Se cuantificó la producción de amonio en distintas condiciones de CO₂ atmosférico: 0% (rojo), 5% (verde) y 20% (azul).

En la Tabla 8, se presentan los diversos parámetros cinéticos y estequiométricos calculados para los cultivos a 0, 5 y 20% (0.23, 38 y 152 mmHg) de pCO₂.

Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para cultivos de células CHO productoras de AcM a distintas condiciones de CO₂ atmosférico (0, 5 y 20%).

Parámetro	0.03% (0.23 mmHg)	5% (38 mmHg)	20% (152 mmHg)	Unidades
μ	0.01 ± 0.002	0.04 ± 0.003	0.03 ± 0.004	h ⁻¹
Y _{AcM/cel}	16.28 ± 3.553	15.44 ± 0.658	25.76 ± 2.580	pg célula ⁻¹
Y _{cel/Glc}	0.09 ± 0.014	0.35 ± 0.014	0.43 ± 0.035	célula pmol ⁻¹
Y _{Lac/Glc}	1.45 ± 0.098	1.42 ± 0.065	1.06 ± 0.094	mmol mmol ⁻¹
Y _{Lac/cel}	19.99 ± 2.182	4.17 ± 0.183	2.03 ± 0.035	pmol célula ⁻¹
Y _{cel/Gln}	0.18 ± 0.020	1.49 ± 0.189	2.04 ± 0.183	células pmol ⁻¹
Y _{Glu/Gln}	0.03 ± 0.028	0.07 ± 0.070	0.04 ± 0.033	mmol mmol ⁻¹
Y _{Amm/Gln}	0.67 ± 0.492	0.90 ± 0.072	2.79 ± 0.147	mmol mmol ⁻¹
Y _{Amm/cel}	2.03 ± 0.131	0.41 ± 0.013	0.83 ± 0.076	pmol célula ⁻¹
q _{AcM}	0.15 ± 0.013	0.67 ± 0.069	0.86 ± 0.134	pg células ⁻¹ h ⁻¹
q _{Glc}	0.11 ± 0.07	0.12 ± 0.003	0.08 ± 0.011	pmol célula ⁻¹ h ⁻¹
q _{Lac}	0.19 ± 0.016	0.18 ± 0.018	0.07 ± 0.009	pmol célula ⁻¹ h ⁻¹
q _{Gln}	0.05 ± 0.005	0.03 ± 0.006	0.02 ± 0.001	pmol célula ⁻¹ h ⁻¹
q _{Amm}	0.03 ± 0.023	0.02 ± 0.002	0.03 ± 0.003	pmol célula ⁻¹ h ⁻¹

9.3. Análisis del anticuerpo monoclonal

Se realizó el análisis de variantes de carga, así como del patrón de N-glicosilación a partir del AcM purificado para cada una de las tres condiciones evaluadas.

9.3.1. Variantes de carga

La heterogeneidad de las cargas presentes en los anticuerpos monoclonales es relevante debido a los efectos que pudiera tener en la farmacocinética y farmacodinámica de la proteína. Aspectos como la retención y distribución en los tejidos, la inmunogenicidad y la remoción del torrente sanguíneo pueden modificarse debido a la carga neta de la

proteína (Boswell *et al.*, 2010). Estas cargas dan origen a las especies principales, ácidas y básicas, y son establecidas de acuerdo con su elución en la cromatografía por intercambio iónico (Du *et al.*, 2012).

En la Figura 17 se presentan las abundancias relativas para las tres especies: principales, ácidas y básicas. Se observa una tendencia donde la abundancia tanto de las especies básicas como ácidas disminuye conforme la pCO₂ incrementa; mientras que las especies principales siguen la tendencia opuesta, con un incremento en la abundancia conforme el pCO₂ incrementó de igual forma. Las especies ácidas, decrecieron de 13.80 ± 2.39 a 7.14 ± 0.34 %, al incrementar pCO₂ de 0 a 20% (0.23 a 152 mmHg). Mientras que la abundancia de especies básicas disminuyó de 20 ± 0.97 a 12.29 ± 1.22 % al incrementar de 0 a 20% (0.23 a 152 mmHg) de pCO₂. La disminución de abundancia de las especies ácidas y básicas a 20% (152 mmHg) de CO₂ se vio reflejada en el incremento en la abundancia de las especies principales para esta misma condición, con una abundancia relativa del 80.76 ± 1.02 %. Mientras que, para las condiciones de 0 y 5% (0.23 y 38 mmHg) de pCO₂, la abundancia de las especies principales presentó valores de 66.19 ± 3.35 y 76.29 ± 0.74 %, respectivamente.

Dentro de las especies ácidas se incluyen modificaciones como la desamidación, sialilación, glicación, reducción de enlaces disulfuro, entre otros (Du *et al.*, 2012). La generación de estas especies está relacionada con aspectos como la composición del medio, tiempo de residencia y pH del cultivo (Chung *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2016). De manera similar a los resultados obtenidos en este trabajo, un anticuerpo tipo IgG₁ producido a pH 6.8 presentó una mayor abundancia de especies ácidas en comparación con los procesos a pH 7.0 y 7.2 (Brunner *et al.*, 2017). Mientras que contrario a los resultados obtenidos, no se reportó un efecto de los niveles elevados de pCO₂ (250 mmHg) en la heterogeneidad de cargas ni en el punto isoeléctrico de un anticuerpo tipo IgG_{2A} producido en cultivos de hibridomas murinos en medio libre de suero (Schmelzer & Miller, 2002). En el presente trabajo las diferencias observadas en la abundancia de las especies ácidas para el anticuerpo producido bajo las condiciones evaluadas serían principalmente resultado del pH que presentaron los cultivos y no por el nivel de pCO₂ empleado en estos.

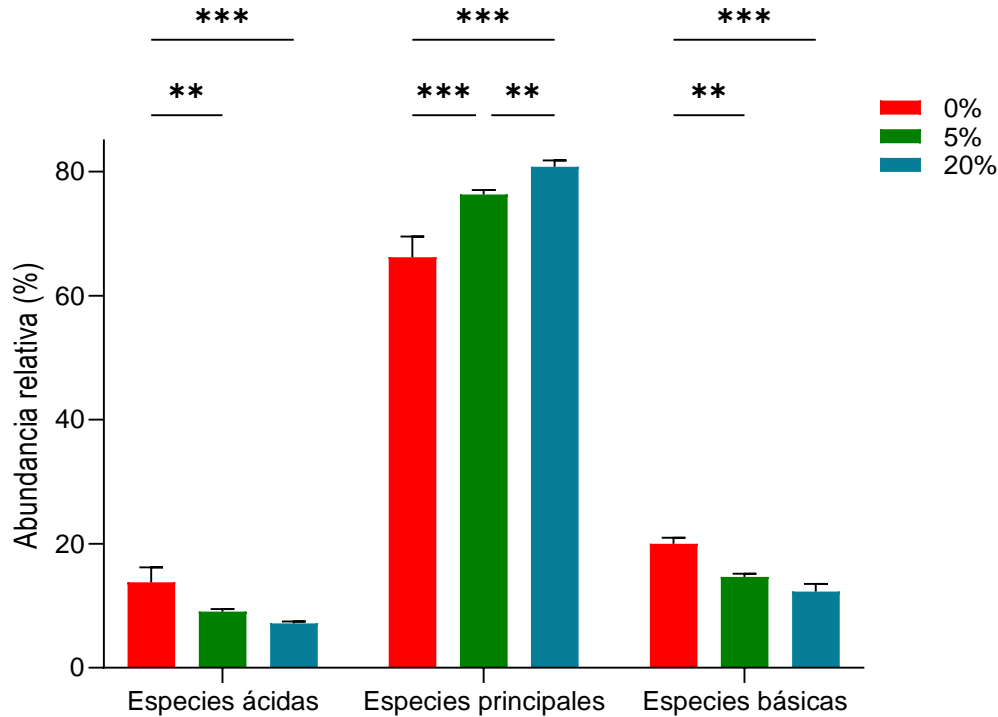


Figura 17. Abundancia relativa de las variantes de carga del AcM. Se muestran los porcentajes correspondientes a cada una de las isoformas para cada una de las condiciones evaluadas (0.03, 5 y 20% de pCO₂ atmosférico). P = 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***).

Se ha reportado que la presencia de residuos de lisina en el extremo C-terminal es la principal contribuyente a la formación de especies básicas, no obstante, modificaciones como oxidación de ciertos aminoácidos, la formación de succinimida, y la asialilación, entre otros, también contribuyen a la formación de este tipo de variantes de carga (Du *et al.*, 2012; Khawli *et al.*, 2010). Con la finalidad de elucidar si la diferencia en la abundancia relativa de especies básicas era principalmente por residuos de lisina presentes, las muestras de anticuerpo producidas en las tres condiciones se sometieron a una digestión con la enzima carboxipeptidasa B (CPB) (Ref. 10103233001, Roche) incubando durante 2 h a 37 °C. En la Figura 18, se muestran en comparativa las abundancias de las especies básicas antes (CPB-) y después (CPB+) de someter a digestión al anticuerpo con carboxipeptidasa. En las tres condiciones se observa una disminución de la abundancia de esta variante después de haber realizado la digestión enzimática, por lo que puede concluirse que en las tres condiciones hubo una remoción incompleta de lisinas durante el cultivo por parte de la maquinaria celular. Estas diferencias en la abundancia relativa ($\Delta\%$) corresponderían al contenido de lisinas

terminales removidas del AcM, en la Tabla 9 se observa que el AcM producido a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ presentó un mayor porcentaje de lisinas terminales removidas (10.71 ± 2.30 %) con el tratamiento enzimático. Este resultado indicaría una menor remoción por parte de la célula durante el cultivo en comparación con las otras dos condiciones donde la Δ% fue similar, 6.41 ± 0.94 y 6.67 ± 1.88 % para la condición de 5 y 20% (0.23 y 38 mmHg) de pCO₂, respectivamente.

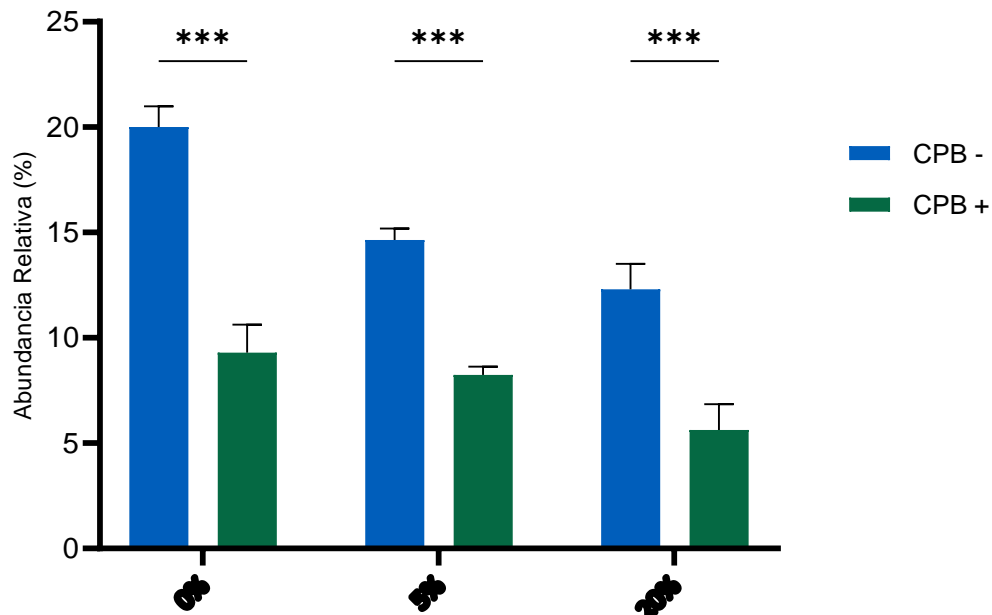


Figura 18. Abundancia relativa de las especies básicas antes y después de digestión con CPB. Se muestran los % de abundancia correspondientes a las especies básicas para cada una de las condiciones evaluadas (0, 5 y 20% de CO₂ atmosférico) antes y después de digerir con carboxipeptidasa. P = 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***).

Tabla 9. Contenido de lisina removido con CPB del AcM producido a diferentes niveles de pCO₂.

0.03%	5%	20%
10.71 ± 2.30	6.41 ± 0.94	6.67 ± 1.88

NOTA: Los valores se muestran en términos de %.

Existe evidencia que indica que la remoción incompleta de lisinas se encuentra asociada a procesos enzimáticos intracelulares y extracelulares, donde la enzima carboxipeptidasa y, particularmente, la isoforma D es la responsable de realizar esta modificación (Dick et al., 2008; Hu et al., 2016; Luo et al., 2012). De acuerdo con nuestros resultados, hubo un mayor contenido de lisina terminal para el AcM producido a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂, donde también se registraron niveles de pH más bajos en el medio, en

comparación con las otras dos condiciones donde el pH se mantuvo relativamente más estable. Por lo tanto, es probable que la formación de especies básicas se deba en mayor medida a la alteración de la actividad enzimática de la carboxipeptidasa, debido a cambios en el pH del medio, en lugar de los niveles de pCO₂ utilizados en este estudio.

9.3.2. N-glicosilación

Se realizó el análisis del patrón de glicosilación del AcM purificado previamente. En la Figura 19, se muestran las abundancias relativas para los principales grupos de glicanos detectados mediante interacción hidrofílica por UPLC. Las estructuras identificadas se agruparon en glicanos fucosilados, no galactosilados (G0), altos en manosa (principalmente Man5), galactosilados (G1 y G2) e híbridos.

Se observaron diferencias significativas para los glicanos tanto galactosilados, como no galactosilados, con tendencias opuestas entre sí. La abundancia relativa de los glicanos no galactosilados incrementó de 73.77 ± 5.08 a 84.26 ± 3.44 % conforme los niveles de pCO₂ incrementaron de 0 a 20% (0.23 a 152 mmHg), mientras que la abundancia de los glicanos galactosilados disminuyó de 19.50 ± 1.49 a 6.55 ± 3.27 %. De igual manera, los glicanos altos en manosa e híbridos presentaron un incremento en sus abundancias relativas al incrementar los niveles de pCO₂, aunque solamente en el segundo grupo las diferencias fueron significativas. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la abundancia de glicanos fucosilados para las tres condiciones evaluadas.

En la Tabla 10 se muestran las abundancias relativas para los distintos glicanos identificados.

Tabla 10. Abundancias relativas de los glicanos identificados en el anticuerpo monoclonal producido a distintos niveles de pCO₂ atmosférico.

Glicano	0%	5%	20%
G0	73.77 ± 5.08	82.19 ± 0.91	84.26 ± 3.44
G1	18.28 ± 1.64	11.95 ± 1.78	6.26 ± 3.12
G2	1.22 ± 0.17	0.69 ± 0.18	0.29 ± 0.15
Fucosilados	92.97 ± 3.36	95.94 ± 0.17	93.77 ± 3.30
Altos en manosa	1.98 ± 0.09	1.51 ± 0.10	3.37 ± 2.49
Híbridos	2.07 ± 0.09	3.12 ± 0.91	5.69 ± 2.68

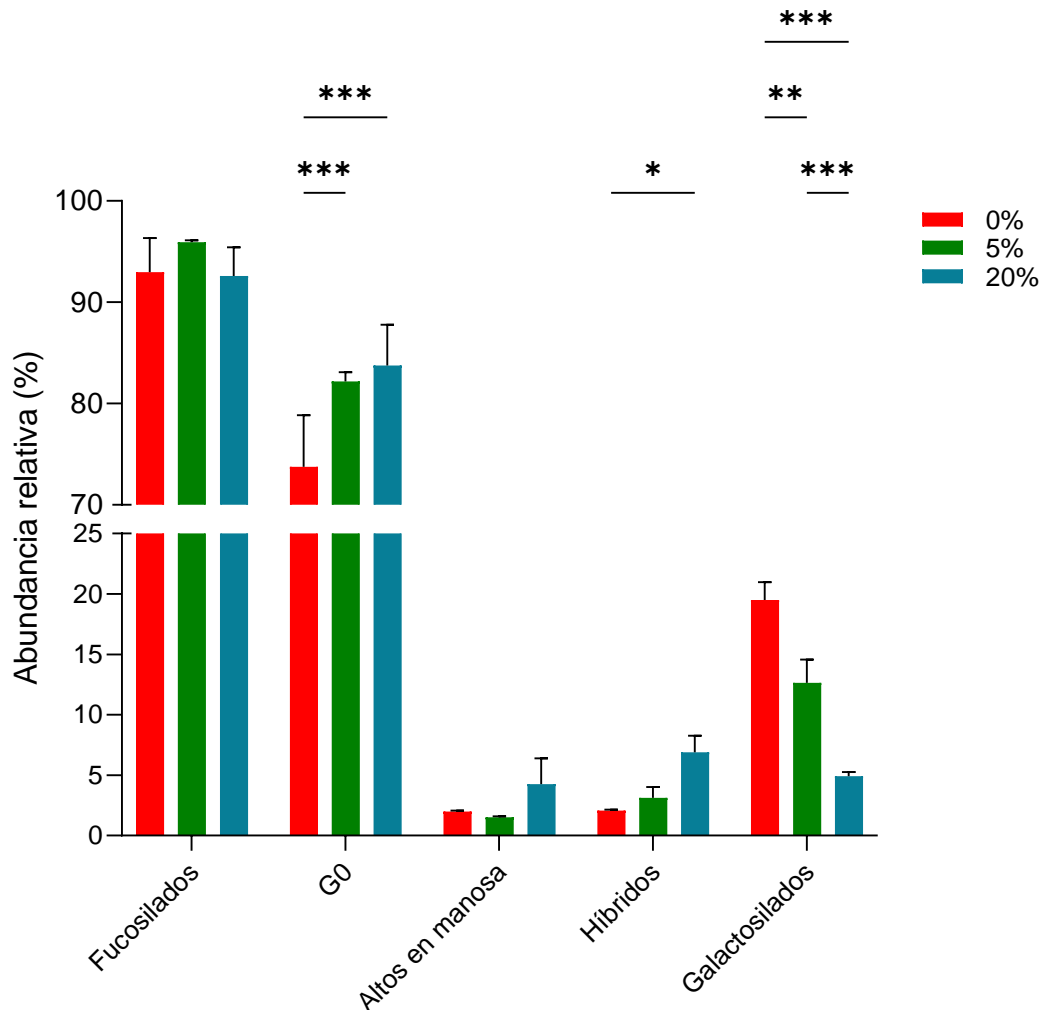


Figura 19. Abundancia relativa de los principales glicanos presentes en el AcM. Se determinó el perfil de N-glicosilación del AcM producido bajo distintas condiciones de pCO₂. P = 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***).

Perfiles similares fueron obtenidos por Brunner *et al.* (2017), donde alrededor del 75% de los glicanos reportados fueron G0F (no galactosilados, fucosilados) y G1F (monogalactosilados, fucosilados). En este mismo estudio, se observaron abundancias de entre 25-30% para los glicanos monogalactosilados (G1) mientras que hubo entre 4-8% de glicanos no fucosilados. En contraste, Schmelzer & Miller (2002) reportaron un incremento en un anticuerpo de tipo IgG_{2A} en la galactosilación y un decremento en la manosilación, al incrementar la pCO₂ de 40 a 250 mmHg (5.3 a 32.9%).

Es posible que las variaciones en la abundancia relativa de los glicanos del AcM, mostradas en la Figura 19, se deban a diferencias en las actividades de las enzimas de la vía de N-glicosilación. Se ha reportado que la alta formación de glicanos G0 se ve

favorecida por bajas actividades de la enzima β 1,4-galactosiltransferasa (Wei *et al.*, 2021). Por otro lado, se ha reportado que la formación de glicanos altos en manosa e híbridos se ve comprometida por la actividad de N-acetil-glucosaminil transferasas (Mastrangeli *et al.*, 2020). En ambos casos, alteraciones del pH en el aparato de Golgi pueden inhibir la maduración de estas estructuras a glicanos híbridos o complejos, derivando así en la formación de glicanos sin procesar como lo son G0 y Man5 (Mastrangeli *et al.*, 2020; Rivinoja *et al.*, 2009).

9.4. Actividad enzimática

Debido a las alteraciones en las abundancias aquí observadas en los glicanos galactosilados y no galactosilados, se determinó la actividad de las enzimas galactosidasa y manosidasa; esta última se midió debido a la relevancia del contenido en manosa en los AcM, así como para determinar la posible exposición de la glicoproteína a la actividad manosidasa en el medio de cultivo. Dado que el AcM se expone a las glicosidasas presentes en el aparato de Golgi (intracelular) y en el medio de cultivo (extracelular), este último debido a su liberación al medio una vez que la célula deja de ser viable; se midió la actividad de ambas actividades enzimáticas. Por medio de digestiones con lisados celulares o sobrenadante, se determinó la actividad intracelular y extracelular, respectivamente.

En la Figura 20 se muestra el comportamiento de la actividad galactosidasa extracelular para cada una de las condiciones de pCO₂ establecidas. Se observa cómo tanto los cultivos control como los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂ alcanzan una máxima actividad de aproximadamente 150×10^{-6} U mL⁻¹ a las 168 h, mientras que la mayor actividad para la condición del 0.03% (0.23 mmHg) fue de aproximadamente 50×10^{-6} U mL⁻¹ a las 120 h de cultivo.

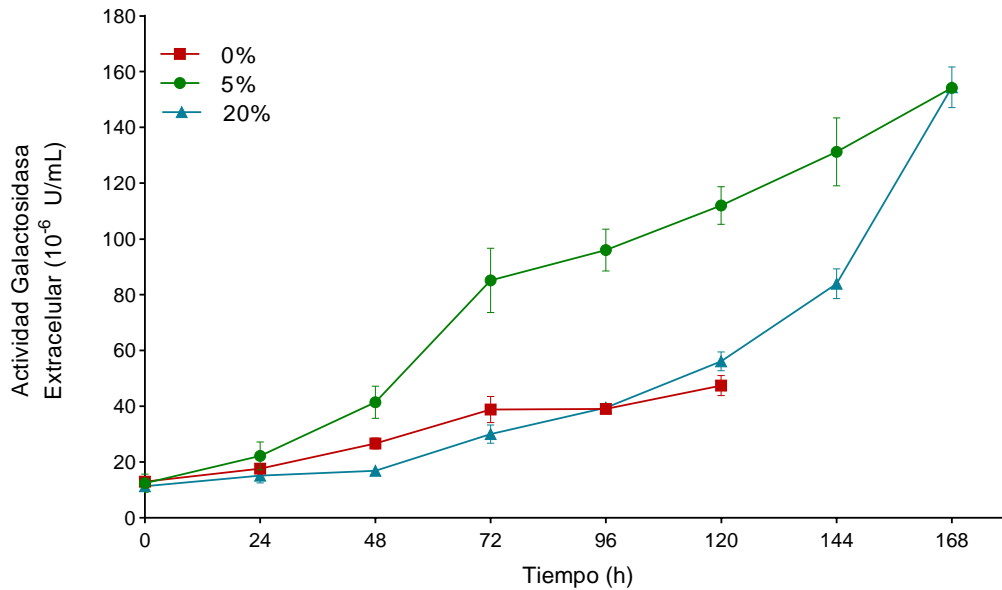


Figura 20. Actividad galactosidasa extracelular. Se cuantificó la actividad galactosidasa extracelular a partir de sobrenadante de los cultivos realizados a 0.03, 5 y 20 % de pCO₂ atmosférico. Condiciones de reacción: 37°C, buffer de glicina 0.2 M pH 10.5, sustrato 4-MU β-D-galactopiranosido 1 mM.

En la Figura 21 se muestra la actividad galactosidasa de lisados celulares obtenidos a lo largo del cultivo. De nueva cuenta, se observó la mayor actividad enzimática para los lisados celulares obtenidos de los cultivos a 20% (152 mmHg) de pCO₂, con un pico máximo a las 72 h. Respecto a los lisados provenientes de los cultivos control, se observa una tendencia donde la actividad enzimática es menor a lo largo del cultivo en comparación con la condición anterior. Para la condición de 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂, se observó la actividad más baja de entre las tres condiciones hasta las 96 h de cultivo, a partir de las 120 h en la condición control se presentó la menor actividad enzimática.

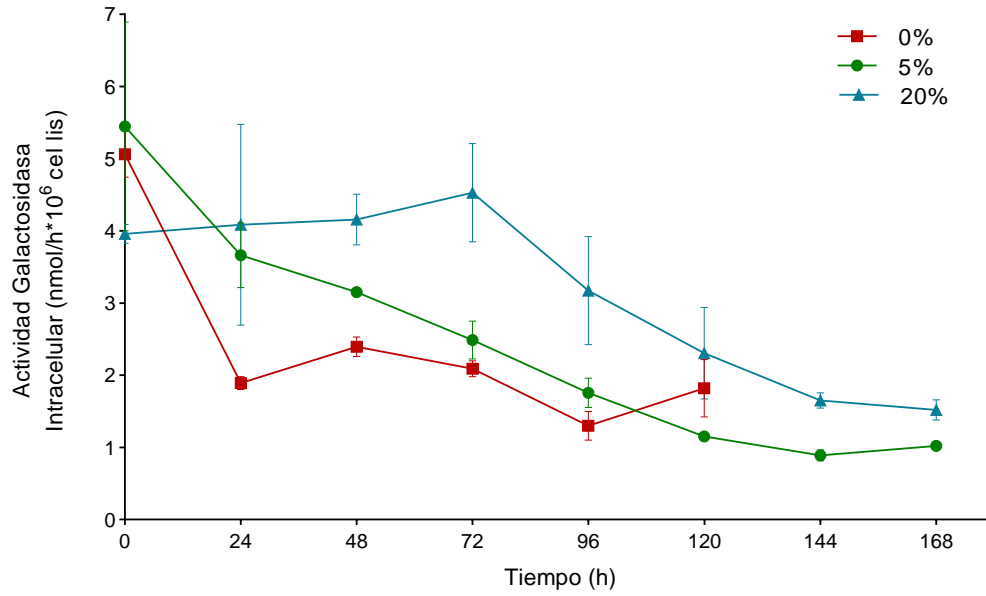


Figura 21. Actividad galactosidasa intracelular. Se cuantificó la actividad galactosidasa intracelular a partir de lisados celulares de los cultivos realizados a 0.03, 5 y 20 % de pCO₂ atmosférico. Condiciones de reacción: 37°C, buffer de glicina 0.2 M pH 10.5, sustrato 4-MU β-D-galactopiranosido 1 mM.

En la Figura 22, se muestra la actividad manosidasa extracelular obtenida de cada uno de los cultivos. La mayor actividad enzimática se observa en los cultivos a 20% (152 mmHg) pCO₂, con un valor de $513.25 \pm 11.05 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$. Dicho valor máximo se observó a las 168 h de cultivo. Mientras que para los cultivos control, se observa una actividad máxima a las 120 h con un valor de $166.24 \pm 45.81 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$. Finalmente, la mayor actividad observada para los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ se presentó a las 120 h, con un valor de $74.22 \pm 21.71 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$.

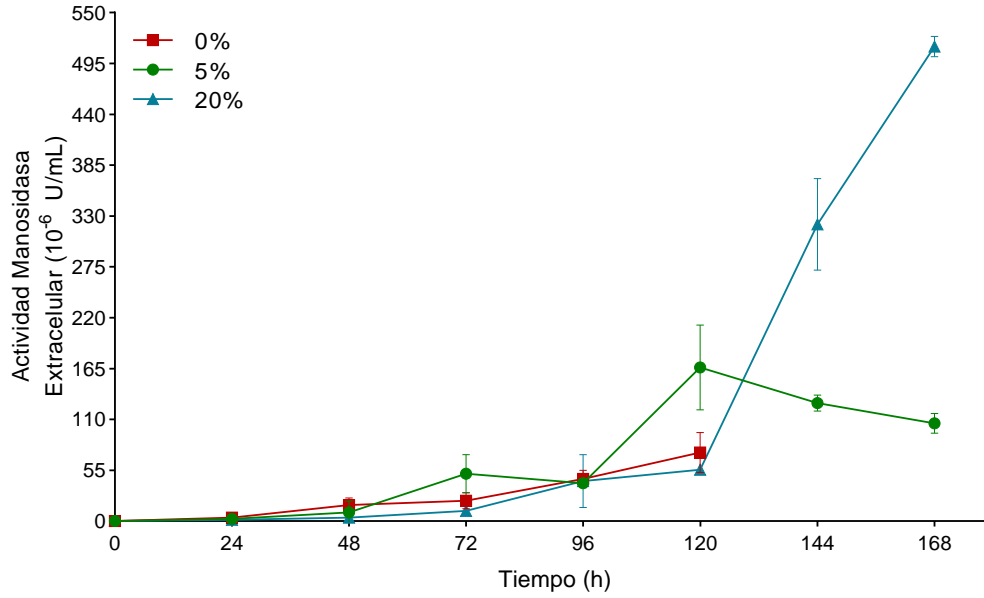


Figura 22. Actividad manosidasa extracelular. Se cuantificó la actividad manosidasa extracelular a partir de sobrenadante de los cultivos realizados a 0.03, 5 y 20 % de pCO₂ atmosférico. Condiciones de reacción: 37°C, buffer de glicina 0.2 M pH 10.5, sustrato 4-MU α-D-manopiranosido 1 mM.

En la Figura 23, se muestran las actividades intracelulares de manosidasa a partir de lisados celulares obtenidos de los cultivos realizados a las distintas condiciones de pCO₂ atmosférico. Al igual que con la actividad galactosidasa intracelular, se observa una correlación entre la presencia de la actividad manosidasa y la cantidad de células a partir de las que se obtuvieron los lisados. Tanto la condición control como la condición de 20% (152 mmHg) pCO₂ presentan un pico en la actividad a las 96 y 120 h, respectivamente. Mientras que, como se ha observado anteriormente, la menor actividad se presentó en los lisados provenientes de los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂.

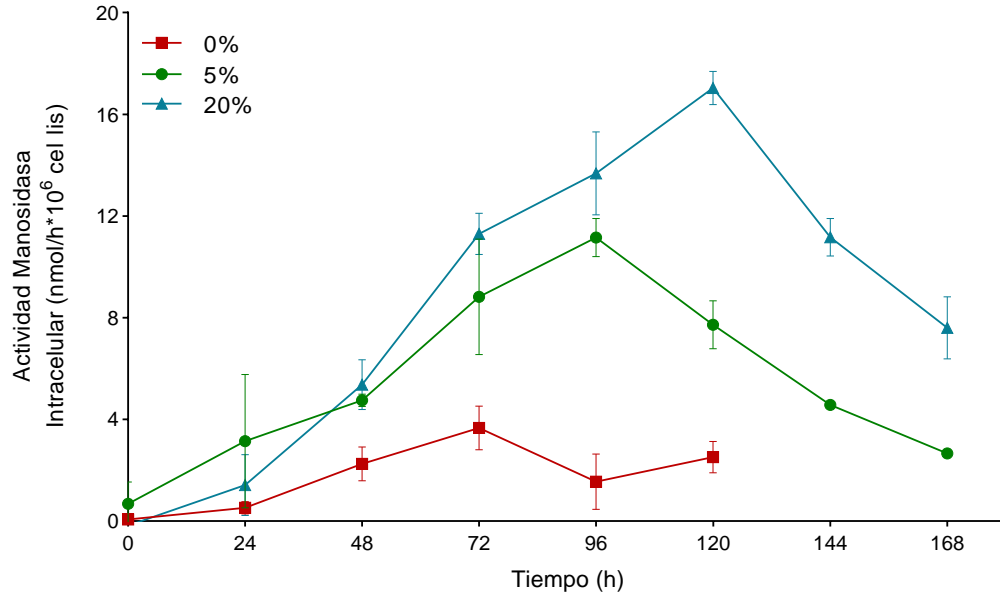


Figura 23. Actividad manosidasa intracelular. Se cuantificó la actividad manosidasa intracelular a partir de lisados celular de los cultivos realizados a 0.03, 5 y 20 % de pCO₂ atmosférico. Condiciones de reacción: 37°C, buffer de glicina 0.2 M pH 10.5, sustrato 4-MU α-D-manopiranosido 1 mM.

Hasta donde tenemos conocimiento, poca información se tiene acerca de los efectos del CO₂ sobre la actividad galactosidasa. De manera similar a nuestros resultados, Schmelzer & Miller (2002) no reportaron cambios significativos en la actividad β-galactosidasa extracelular proveniente de cultivos de hibridomas murinos en condiciones de pCO₂ elevadas (250 mmHg) en comparación con la condición control (40 mmHg). Por otro lado, no se ha estudiado el efecto del CO₂ sobre la actividad manosidasa.

Las actividades galactosidasas y manosidasa encontradas parecieran tener relevancia sobre los perfiles de N-glicosilación encontrados (Gramer, 2000). No obstante, las actividades manosidasas no serían el principal factor que darían lugar a la formación de glicanos altos en manosa. Este comportamiento sería debido principalmente a deficiencias en la actividad transferasa de distintas enzimas que impediría el posterior procesamiento del glicano. Si bien, las actividades galactosidasas podrían contribuir a la generación de glicanos no galactosilados, esta no sería la causa exclusiva de su formación. Deficiencias en actividades galactosiltransferasa, serían determinantes para la obtención de glicanos sin residuos de galactosa terminal.

Al analizar la actividad extracelular de ambas enzimas respecto a la biomasa presente en el cultivo se observan tendencias distintas (ver Apéndice 12.4). La mayor actividad

galactosidasa intracelular se presentó para los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂, mientras que a 20% (152 mmHg) de pCO₂ se presentó la menor actividad. De manera similar, la condición de 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ presentó la mayor actividad manosidasa extracelular a lo largo del cultivo de entre las tres condiciones evaluadas. No obstante, tanto la condición de 0.03% (0.23 mmHg) como de 20% (152 mmHg) de pCO₂ presentaron actividades enzimáticas similares de aproximadamente 50 U/cel al final de los cultivos.

9.5. Efecto de la pCO₂ sobre la expresión de genes de interés en células CHO

A pesar de que el metabolismo de CHO ha sido ampliamente investigado, hasta el momento no ha habido estudios que evalúen el impacto del CO₂ en el metabolismo celular de CHO (*C. griseus*), a nivel transcripcional. Para evaluar el efecto del CO₂ a nivel transcripcional se propusieron genes que estuvieran involucrados en el metabolismo celular, además de seleccionar las secuencias transgénicas correspondientes a las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal modelo. De esta forma, los genes seleccionados se relacionan con el consumo de metabolitos como la glutamina (*gls*), la producción de lactato (*ldhA*), la regulación del sistema CO₂/HCO₃⁻ (*ca5B*), modificaciones post traduccionales del anticuerpo (*cpD*) y las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera de la proteína recombinante (IgG LC e IgG HC).

Los oligonucleótidos de los genes de interés, así como del gen normalizador (*eif3K*), se diseñaron con base en las secuencias depositadas en la base de datos CHOgenome.org (2022), y con las secuencias correspondientes a las cadenas del anticuerpo, las cuales son de carácter confidencial. Se verificó por medio de una PCR de punto final y electroforesis el correcto funcionamiento de los oligonucleótidos, corroborando que estos generaran un único producto del tamaño esperado (ver Apéndice 12.6).

Los niveles de expresión obtenidos para cada una de las condiciones en distintos tiempos, a las 48 y 120 h, se muestran como valores relativos a *eif3K*.

9.5.1. Genes relacionados con el metabolismo celular

El gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa (*ldhA*) fue estudiado (Figura 24). Como se demostró en este trabajo, el CO₂ tiene impacto sobre la producción de este metabolito originado a partir del consumo de glucosa. En este caso, el perfil transcripcional nos muestra que, a las 48 h para los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂, hay una mayor expresión de este gen decayendo el nivel a las 120 h. Este perfil coincide con la fuerte producción de lactato en esta condición donde se dio la mayor acumulación de este metabolito, que no logró ser catabolizado posteriormente debido a la caída de la viabilidad celular y marcando el final del cultivo. Para la condición a 20% (152 mmHg) de pCO₂ se presentó un incremento en la expresión de *ldhA* a las 120 h. Si bien, fue en este momento cuando el lactato comenzó a ser catabolizado (ver Figura 13), este comportamiento no se vería influenciado por la sobre expresión de *ldhA*. Dado que la reacción de consumo del lactato se encuentra favorecida por la isoforma B de la enzima (*ldhB*) (Hartley *et al.*, 2018), la sobre expresión y, por lo tanto, la actividad catalítica de esta isoforma predominaría para dar lugar al consumo de este metabolito. La expresión de *ldhA* se encuentra regulada por las vías de señalización de las proteínas kinasas A y C, además de ser inducida por el cAMP (Jungmann *et al.*, 1998) El cAMP puede actuar como molécula sensora del CO₂, desencadenando una serie de reacciones que permiten la regulación transcripcional del gen (Phelan *et al.*, 2021).

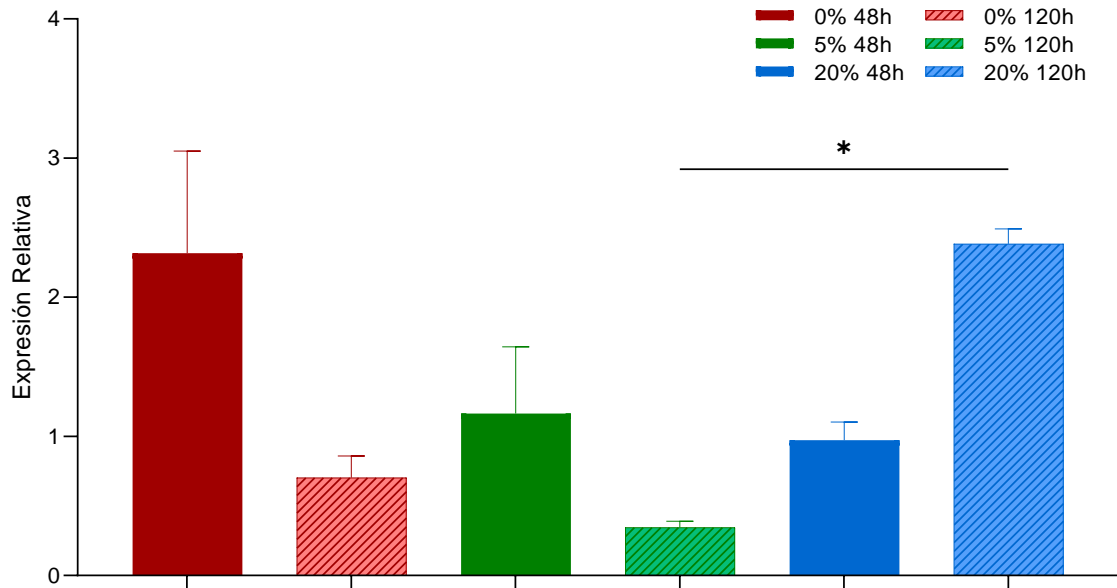


Figura 24. Expresión relativa del gen de la lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Se evaluó el nivel de expresión del gen *ldhA* a distintos niveles de $p\text{CO}_2$ atmosférico (0.03, 5 y 20%) en dos tiempos distintos de cultivo (48 y 120 h). $P = 0.12$ (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***)

En la Figura 25 se muestran los niveles de expresión del gen de la glutaminasa (*gls*), los cuales fueron mayores a las 48 h para la condición a 0.03% (0.23 mmHg) de $p\text{CO}_2$. Existe una aparente correlación entre el nivel de expresión de este gen y el consumo de glutamina; puesto que hubo una mayor tasa de consumo de glutamina (0.05 ± 0.005 pmol célula⁻¹ h⁻¹) en comparación con las otras dos condiciones evaluadas. En cambio, la alta expresión en la condición a 20% (152 mmHg) de $p\text{CO}_2$ no se vería reflejada en el consumo de glutamina puesto que en esta condición se obtuvo la menor tasa de consumo (0.02 ± 0.001 pmol células⁻¹ h⁻¹). La transcripción de este gen se encuentra regulada por los factores de transcripción c-Myc y c-Jun, los cuales son genes blanco de la vía de señalización Wnt (Lukey *et al.*, 2016; Mafra & Dias, 2019), y que es regulada por niveles elevados de CO_2 (Shigemura *et al.*, 2019, 2020).

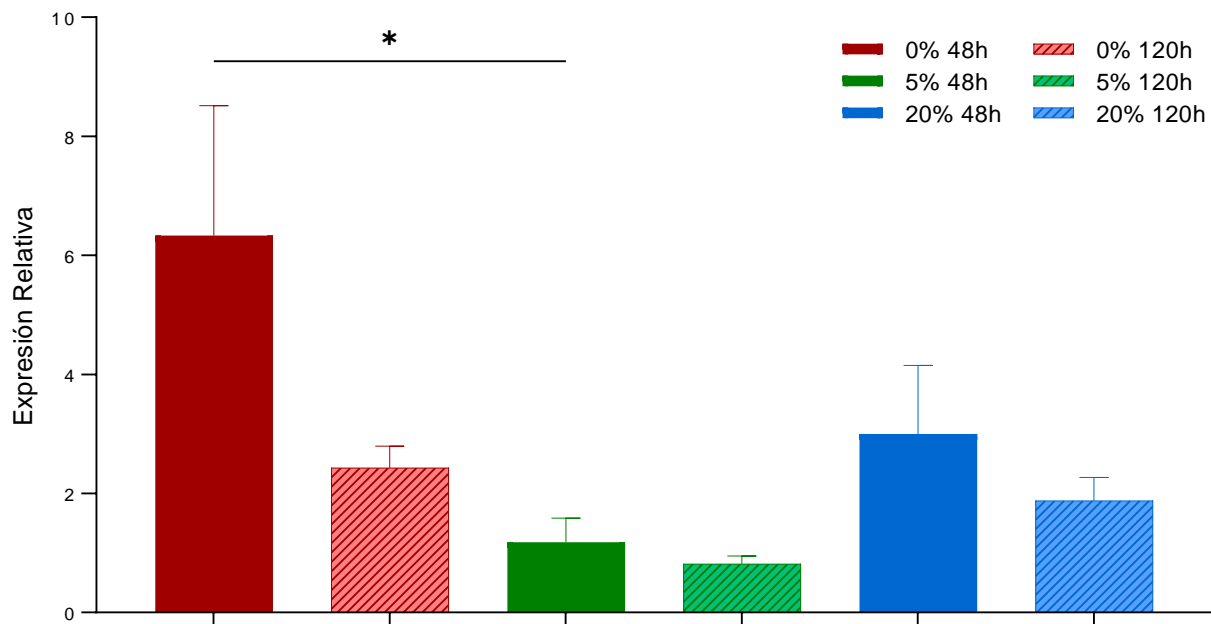


Figura 25. Expresión relativa del gen de la glutaminasa (*gls*). Se evaluó el nivel de expresión del gen *gls* a distintos niveles de pCO₂ atmosférico (0.03, 5 y 20%) en dos tiempos distintos de cultivo (48 y 120 h). P = 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***).

La anhidrasa carbónica 5B, es una isozima localizada en la mitocondria (Fujikawa-Adachi *et al.*, 1999). Debido a esta característica se determinó su expresión en las distintas condiciones de pCO₂ de este trabajo (Figura 26). Se puede observar que hubo una sobreexpresión de este gen en los cultivos a 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ en los dos tiempos muestreados. Mientras que las otras dos condiciones, no mostraron diferencias entre sí, ni entre el tiempo de cultivo. Se ha reportado que la sobreexpresión de este gen en ausencia de CO₂ contribuye a la formación de CO₂ a partir del HCO₃⁻ en el medio (Kosuda *et al.*, 2019). Esto abastece las rutas anapleróticas y al ciclo del TCA de intermediarios, en un esfuerzo por llevar a cabo la proliferación celular. Por otro lado, a las 120 h de cultivo la sobreexpresión de este gen podría deberse al estrés por la disminución del pHi, por lo que puede representar una estrategia celular para mantener la homeostasis celular mediante la interconversión del CO₂ y HCO₃⁻ (Fabregat *et al.*, 2018). En contraste, en las otras dos condiciones las células no estarían sometidas a estos estreses por lo que la sobreexpresión de la anhidrasa carbónica no sería necesaria.

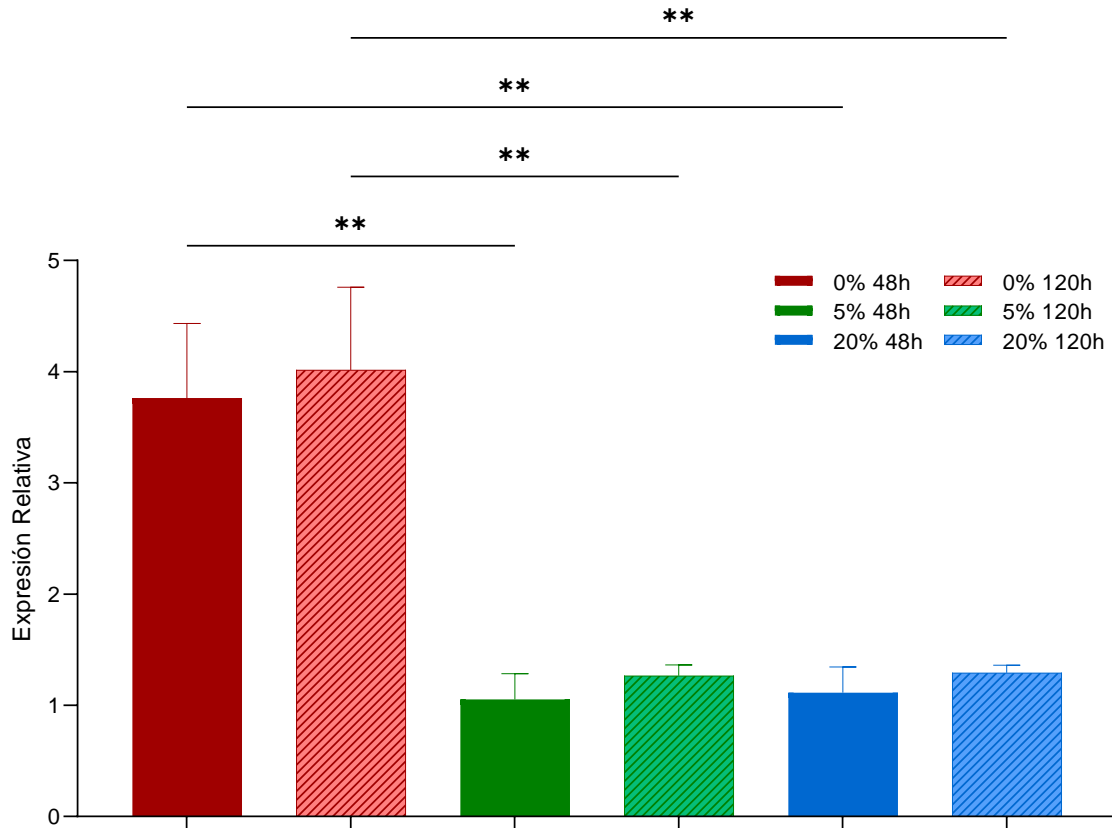


Figura 26. Expresión relativa del gen de la anhidrasa carbónica 5B (ca5B). Se evaluó el nivel de expresión del gen ca5B a distintos niveles de pCO₂ atmosférico (0.03, 5 y 20%) en dos tiempos distintos de cultivo (48 y 120 h). P = 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***).

9.5.2. Genes relacionados con la producción y modificación del anticuerpo monoclonal

Se evaluaron los cambios en la expresión de los transgenes correspondientes a la cadena pesada (IgG HC) y ligera (IgG LC) del anticuerpo monoclonal modelo (Figura 27). Se puede observar que para la condición de 0.03% (0.23 mmHg) de pCO₂ hay un incremento en la expresión de ambos transgenes a las 120 h de cultivo. No obstante, este incremento no se reflejó en la producción de anticuerpo monoclonal, probablemente debido a la degradación del ARN mensajero por las condiciones intracelulares como el pH. La condición control presenta la misma tendencia para ambos transgenes, su expresión decrece a las 120 h en comparación con los niveles observados a las 48 h de cultivo. Por otro lado, se pueden observar tendencias opuestas para la condición a 20% (152 mmHg) de pCO₂; donde la expresión del transgén correspondiente a la cadena pesada

incrementa mientras que la expresión del transgén correspondiente a la cadena ligera disminuye a las 120 h de cultivo en comparación con los valores observados al inicio de los cultivos. Uno de los principales promotores utilizados en células CHO para la expresión de transgenes codificantes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos monoclonales es el promotor de citomegalovirus (CMV). Este promotor puede ser regulado por diversos factores de transcripción entre los que se encuentran NFκ-B (factor nuclear κB), SP1 (proteína de especificidad 1) y CREB (*cAMP Response Element-Binding*) (Romanova & Noll, 2018). Estas proteínas pueden ser reguladas por niveles elevados de CO₂, lo que derivaría en distintos niveles de expresión de los transgenes en las condiciones evaluadas (Cummins *et al.*, 2020; Shigemura *et al.*, 2020).

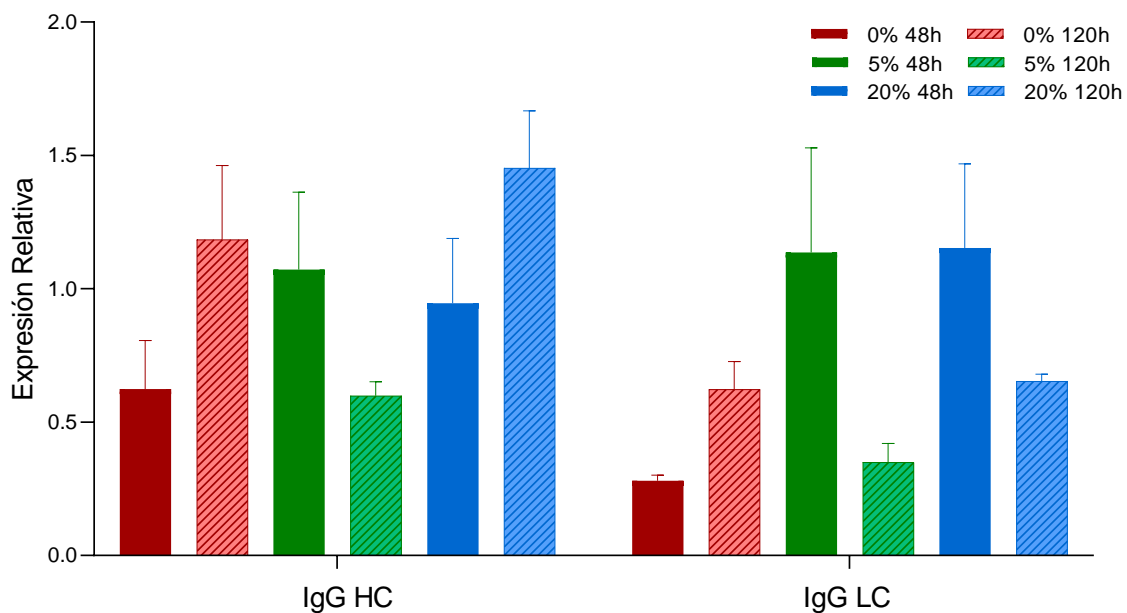


Figura 27. Expresión relativa de los transgenes de las cadenas ligera y pesada del AcM. Se evaluaron los niveles de expresión de los transgenes que codifican para la cadena pesada (IgG HC) y ligera (IgG LC) a distintos niveles de pCO₂ atmosférico (0.03, 5 y 20%) en dos tiempos distintos de cultivo (48 y 120 h). P = 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***).

Finalmente, se evaluó el impacto del CO₂ en los niveles de expresión del gen de la carboxipeptidasa D (*cpD*) (Figura 28), enzima responsable de realizar la escisión de residuos de lisina en los anticuerpos monoclonales (Hu *et al.*, 2016). Debido a esto fue que se propuso su análisis para dilucidar si el CO₂ impactaba a nivel molecular en la formación de especies básicas a partir de la expresión de esta enzima. Se pueden observar los mayores niveles de expresión para la condición sin CO₂ en ambos tiempos.

Sin embargo, en esta condición se obtuvo una mayor abundancia relativa de especies básicas, por lo que se descarta que la expresión de este gen contribuye a la escisión de los residuos de lisina. Por otra parte, se obtuvieron menores niveles de expresión de este gen para la condición de 20% (152 mmHg) pCO₂ al igual que hubo una menor abundancia de especies básicas en esta condición. Con estos resultados, podemos concluir que la formación de especies básicas catalizada por la acción de carboxipeptidasa está más relacionada con el pH del medio que con la expresión de este gen en particular.

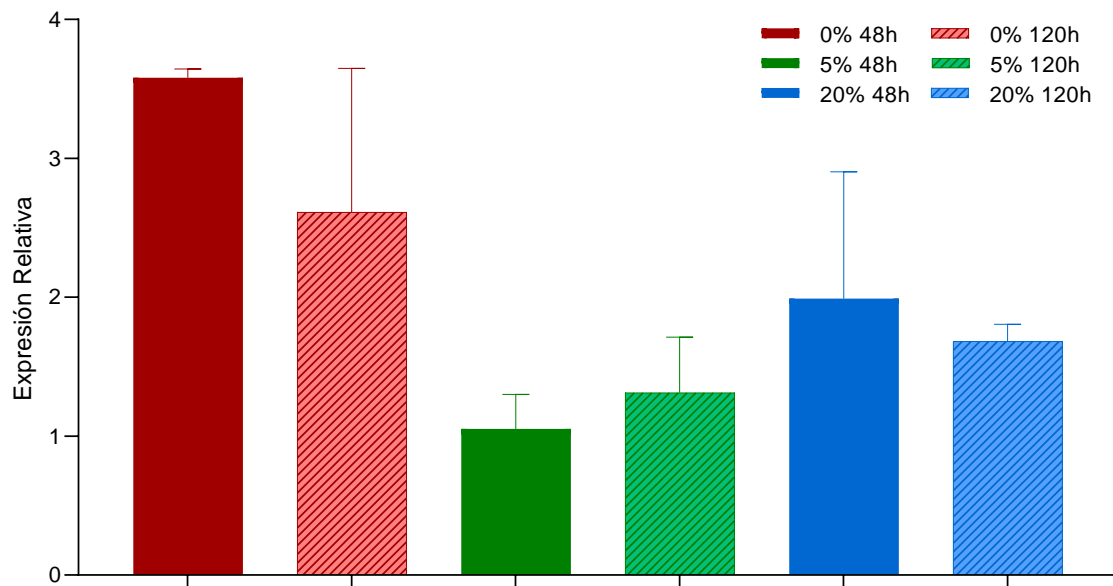


Figura 28. Expresión relativa del gen de la carboxipeptidasa D (*cpD*). Se evaluó el nivel de expresión del gen *cpD* a distintos niveles de pCO₂ atmosférico (0.03, 5 y 20%) en dos tiempos distintos de cultivo (48 y 120 h). $P = 0.12$ (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), <0.001 (***)

10. CONCLUSIONES

Contrario a lo comúnmente reportado en la literatura, niveles elevados de pCO_2 no afectaron el crecimiento y la producción de AcM por parte de la línea celular empleada en el presente trabajo, condición para la cual incluso se obtuvo una mayor cantidad de AcM. Como era de esperarse, la falta de suministro de CO_2 comprometió el crecimiento celular y la producción de AcM, debido a la falta de intermediarios del TCA donde el CO_2 juega un papel importante. Es importante destacar las diferencias en la escala y modo del cultivo celular empleado en comparación con la literatura, dado que pudo ser el factor que influyó en mayor medida en los resultados.

Al evaluar los atributos de calidad de un anticuerpo monoclonal se observó una menor abundancia de especies ácidas y básicas en la condición de 20% de pCO_2 , probablemente favorecidas por el pH del cultivo, el cual se mantuvo relativamente estable. Por otro lado, hubo una mayor abundancia de glicanos no galactosilados para esta misma condición. Si bien hubo una mayor actividad galactosidasa en 20% de pCO_2 , la disminución en el nivel de galactosilación puede deberse a alteraciones en otras actividades enzimáticas como galactosiltransferasas, las cuales se encargan de generar glicanos G1 y G2; por lo que una baja actividad de este tipo de enzimas daría lugar a la formación de glicanos inmaduros tipo G0.

Por otro lado, los resultados obtenidos del análisis transcripcional mostraron que la ausencia o presencia del CO_2 favorece la expresión de determinados genes de acuerdo con las necesidades metabólicas, como en el caso de los genes *ldhA*, *gls* y *ca5B*, los cuales se sobre expresaron al inicio de los cultivos probablemente como respuesta para contender con la falta de CO_2 , lo cual impide un correcto funcionamiento metabólico, repercutiendo en aspectos como el crecimiento celular y la producción de AcM y lactato. En contraste, la sobreexpresión de genes como *cpD* y las cadenas tanto pesadas como ligeras del anticuerpo no derivó en una mayor producción de anticuerpo o remoción de lisinas C-terminales en este. El pH del cultivo en cada condición impactaría en distintos procesos como la estabilidad del ARNm y su posible degradación, o en la actividad de la carboxipeptidasa para la generación de especies básicas. En este sentido, un pH superior

a 7.0 favorecería la traducción adecuada del ARNm y la producción eficiente de AcM. Además, se observaría una mayor actividad de la carboxipeptidasa, lo que resultaría en el corte de una mayor cantidad de residuos de lisina, y una consiguiente disminución de las especies básicas.

La información obtenida en el presente trabajo nos permite profundizar más en el conocimiento del efecto del CO₂ en distintos procesos celulares. No obstante, este primer acercamiento se encuentra limitado tanto por el sistema de cultivo empleado como por los genes evaluados. Sería importante realizar un estudio más amplio donde variables como el pH puedan ser controladas y una mayor cantidad de genes, involucrados tanto en procesos metabólicos como en la correcta producción y modificación del anticuerpo monoclonal, puedan ser evaluados.

11. PERSPECTIVAS

Dado que el sistema de cultivo empleado en este trabajo solo permitió controlar el nivel de $p\text{CO}_2$ en la atmósfera de la incubadora, sería interesante realizar la evaluación de los niveles de expresión en condiciones más controladas, como lo serían en un biorreactor, donde variables como el pH pueden ser monitoreadas y ajustadas en tiempo real. Asimismo, sería muy interesante probar un modo de cultivo que permita alcanzar un estado estacionario prolongado, como lote alimentado, para determinar los efectos a lo largo del tiempo en los aspectos evaluados en este trabajo. En trabajos futuros también será relevante considerar el uso de sensores de CO_2 *in situ* que permiten monitorear en tiempo real la concentración de $d\text{CO}_2$ en el medio, de esta forma la aportación de CO_2 metabólico por parte de las células puede ser considerado.

Si bien, los genes seleccionados nos permitieron visualizar el estado metabólico en algunos procesos celulares, un estudio transcriptómico sería de utilidad para poder identificar los genes y vías de señalización que participan en la respuesta a niveles bajos y altos de $p\text{CO}_2$. Tal estudio debería estar complementado por estudios de proteómica para identificar, de igual manera, las proteínas funcionales involucradas, y poder proponer modelos metabólicos para las condiciones de CO_2 aquí ensayadas. La identificación de genes involucrados en la respuesta a acidosis, así como en la vía de N-glicosilación serían de utilidad para que, por medio de técnicas de ingeniería genética, se puedan proponer estrategias de mejora al modelo celular para un óptimo crecimiento o producción y procesamiento del AcM.

12. APÉNDICES

12.1. Curva estándar para la cuantificación de amonio

Se realizó una curva estándar con distintas concentraciones de cloruro de amonio (NH_4Cl) para determinar la concentración de amonio en el medio de cultivo. A partir de una solución de NH_4Cl 10 mM se realizaron diluciones seriadas para obtener las absorbancias de las siguientes concentraciones: 8, 6, 4, 2, 1 y 0.5 mM. En la Figura 29 se muestra la curva estándar obtenida, incluyendo la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente R^2 .

Las concentraciones de amonio se determinaron utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{NH}_4\text{Cl}] = \frac{\text{Abs} - 0.0266}{0.2108} \quad (14)$$

donde $[\text{NH}_4\text{Cl}]$ es la concentración de amonio a determinar y Abs es la absorbancia leída para cada muestra.

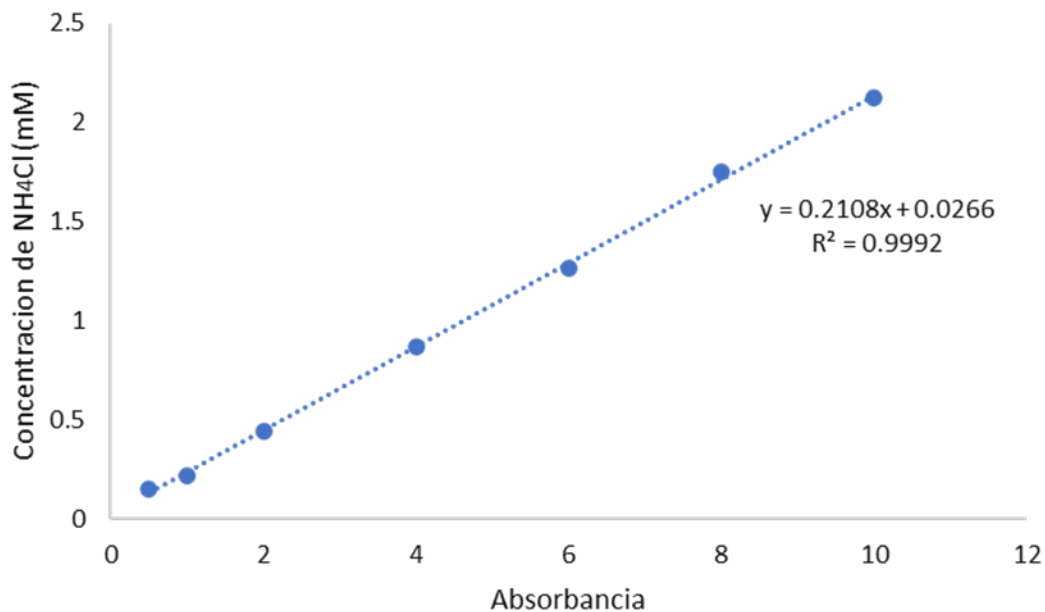


Figura 29. Curva estándar de cloruro de amonio (NH_4Cl).

12.2. Cromatograma típico de un anticuerpo monoclonal

En la Figura 30 se muestra un cromatograma representativo obtenido de la cuantificación del AcM a través de HPLC acoplado a un detector de matriz de fotodiodos.

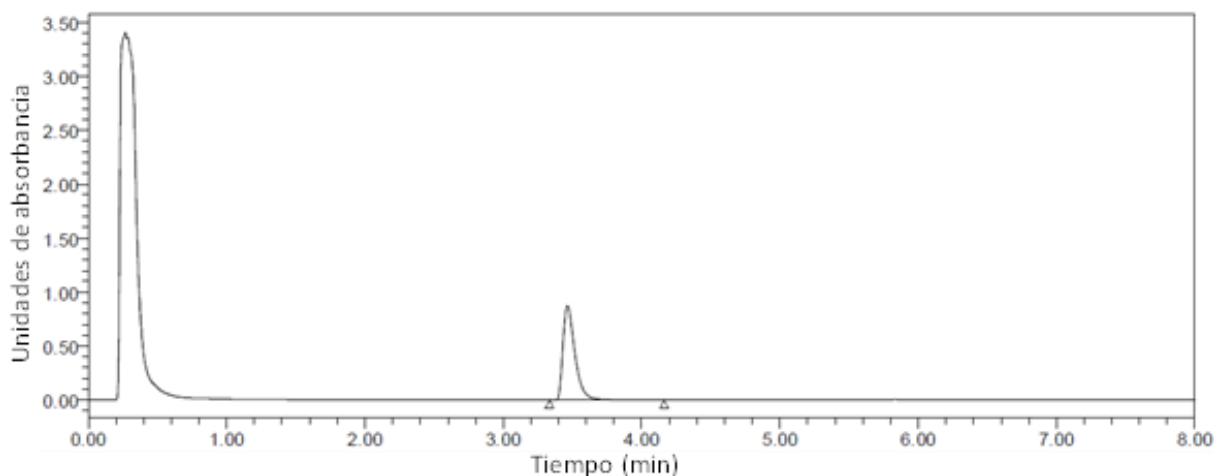


Figura 30. Cromatograma representativo de la cuantificación de un AcM modelo.

12.3. Curva estándar para la cuantificación de la actividad enzimática

Se realizó una curva estándar utilizando el fluoróforo 4-metilumbeliferona (4-MU) (Cat. M1381, Sigma) para la determinación de la concentración de 4-metilumbeliferil α -D-manopiranosido (Cat. M2657, Sigma) y 4-metilumbeliferil β -D-galactopiranosido (Cat. M1633, Sigma). Se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución de 4-MU 0.1 mM para obtener las siguientes concentraciones: 80, 50, 30, 10 y 1 μ M. En la Figura 31 se muestra la curva estándar obtenida, así como la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente R^2 .

Las concentraciones de cada piranosido se determinaron utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{Piranosido}] = \frac{IF - 2.5926}{7.8677} \quad (15)$$

donde [Piranosido] es la concentración de manopiranosido o galactopiranosido a determinar e IF es la intensidad de fluorescencia leída para cada muestra.

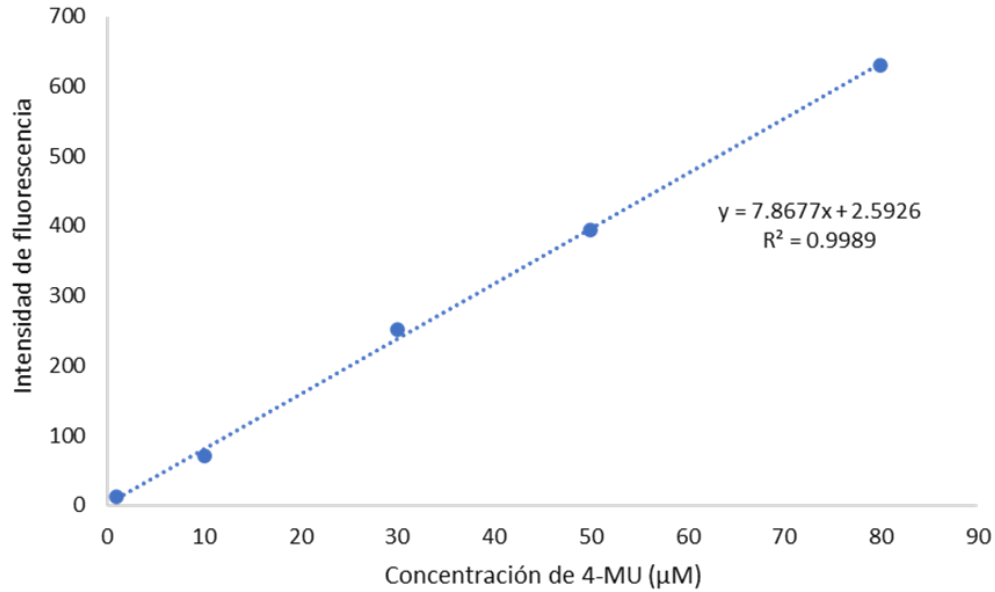


Figura 31. Curva estándar de 4-metilumbeliferona (4-MU) para la determinación de la actividad enzimática manosidasa y galactosidasa.

12.4. Curvas de actividad enzimática

Para una mayor comparación, los valores obtenidos para cada una de las actividades enzimáticas fueron normalizados a $U\ cell^{-1}$. Las curvas para todas las actividades se muestran a continuación.

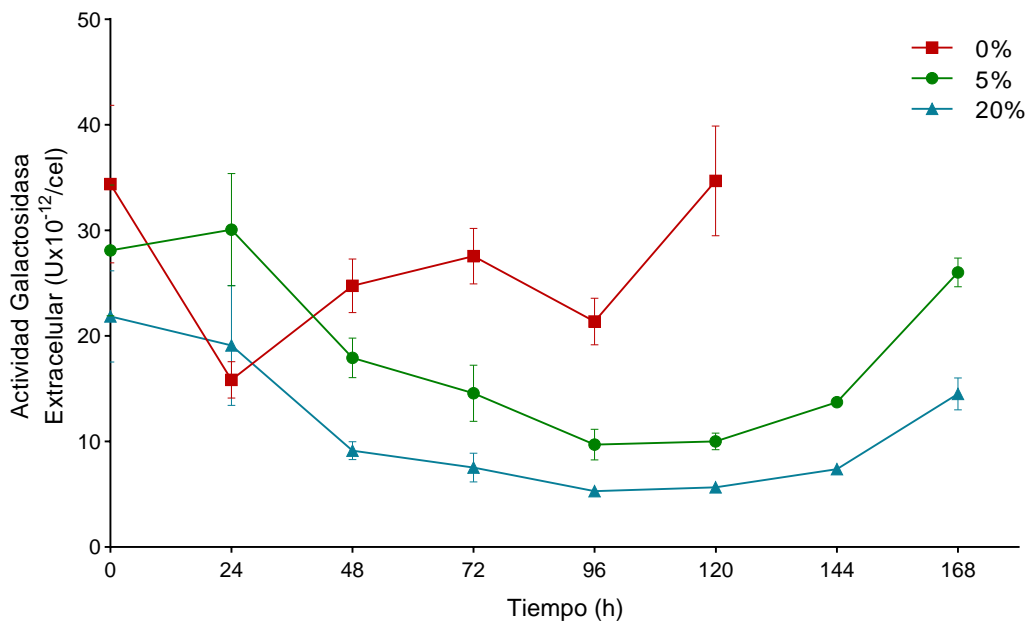


Figura 32. Actividad galactosidasa extracelular.

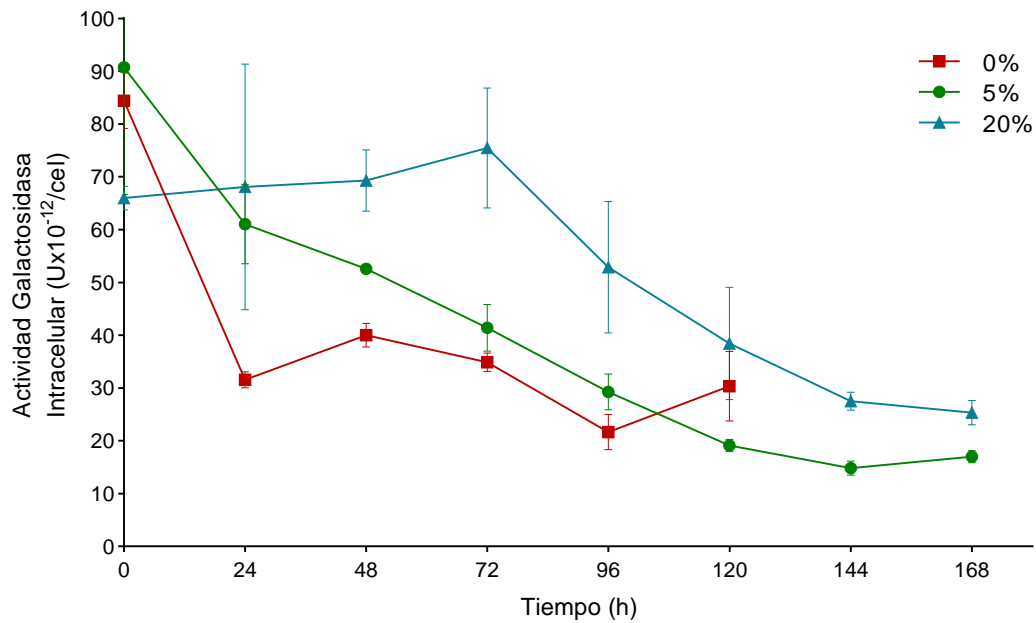


Figura 33. Actividad galactosidasa intracelular.

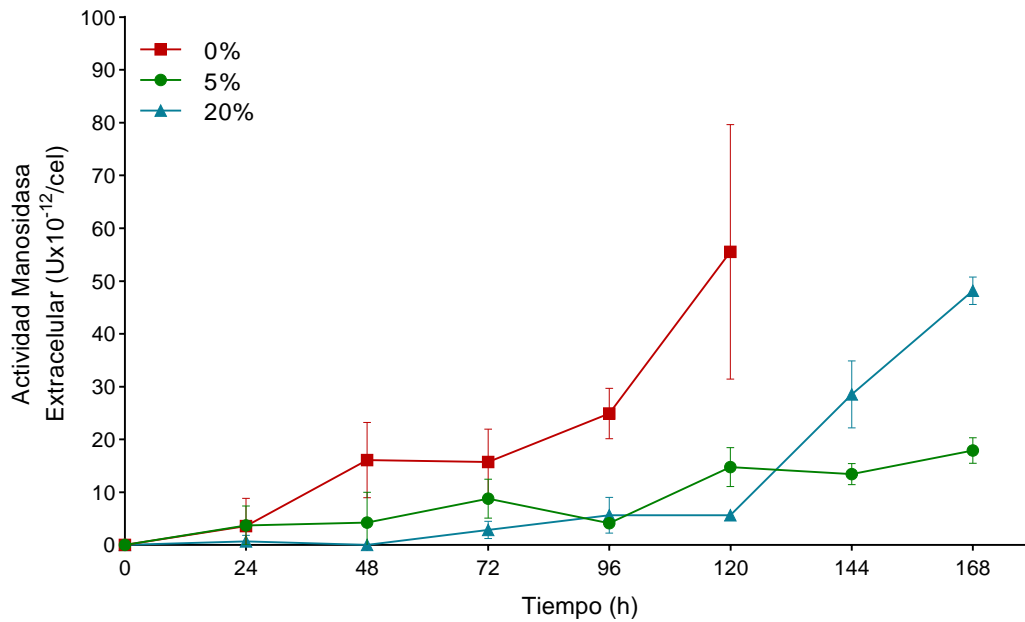


Figura 34. Actividad mannosidasa extracelular.

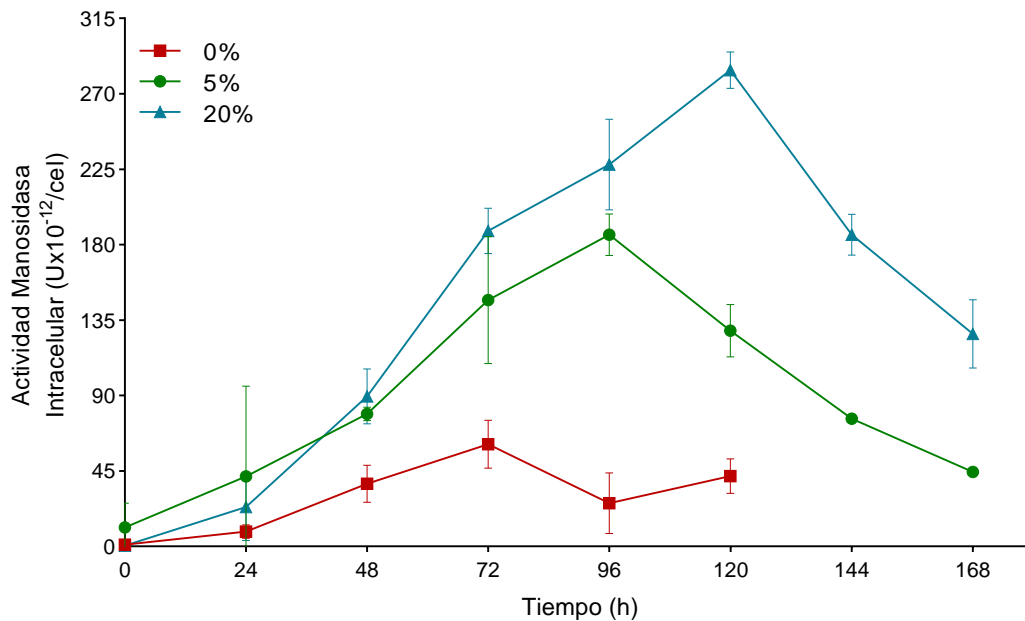


Figura 35. Actividad manosidasa intracelular.

12.5. Cromatograma típico de análisis de N-glicosilación

En la Figura 36 se muestra un cromatograma representativo con las estructuras de los glicanos identificados en un AcM modelo.

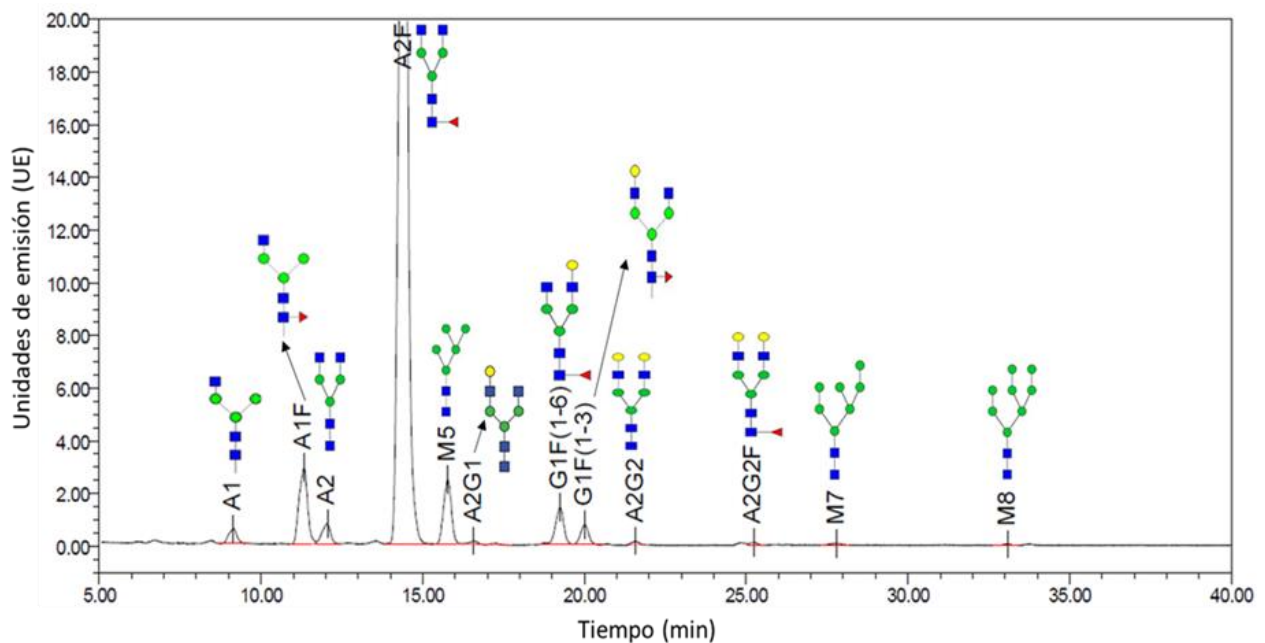


Figura 36. Cromatograma representativo del análisis del patrón de N-glicosilación de un AcM modelo.

12.6. Geles de agarosa para oligonucleótidos

A continuación, se presentan los geles de agarosa que se realizaron con las reacciones de PCR de punto final para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos que se diseñaron. Estos fueron probados con ADNc sintetizado tanto con oligonucleótidos (dT)₁₈ como con hexámeros aleatorios. Se cargaron control sin templado (NTC), controles negativos (dT- y hex-), y controles positivos (dT+ y hex+).

Se realizaron geles de agarosa para los siguientes genes: *ldhA*, *gls*, *ca5B*, *cpD*, *elf3K*, *rps16* y *actB*. La especificidad de los oligonucleótidos correspondientes a las cadenas ligera y pesada del AcM se evaluó directamente por medio de las curvas de disociación obtenidas en las reacciones de RT-PCR (ver Apéndice 12.8).

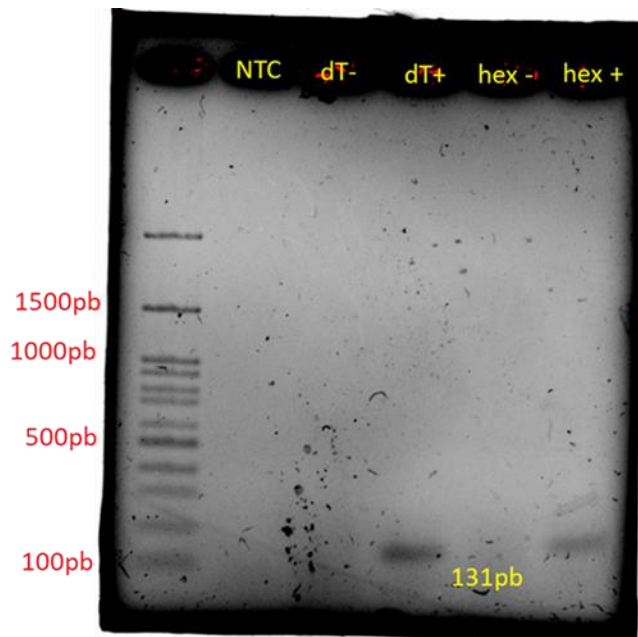


Figura 37. Prueba de oligos para el gen *ldhA*.

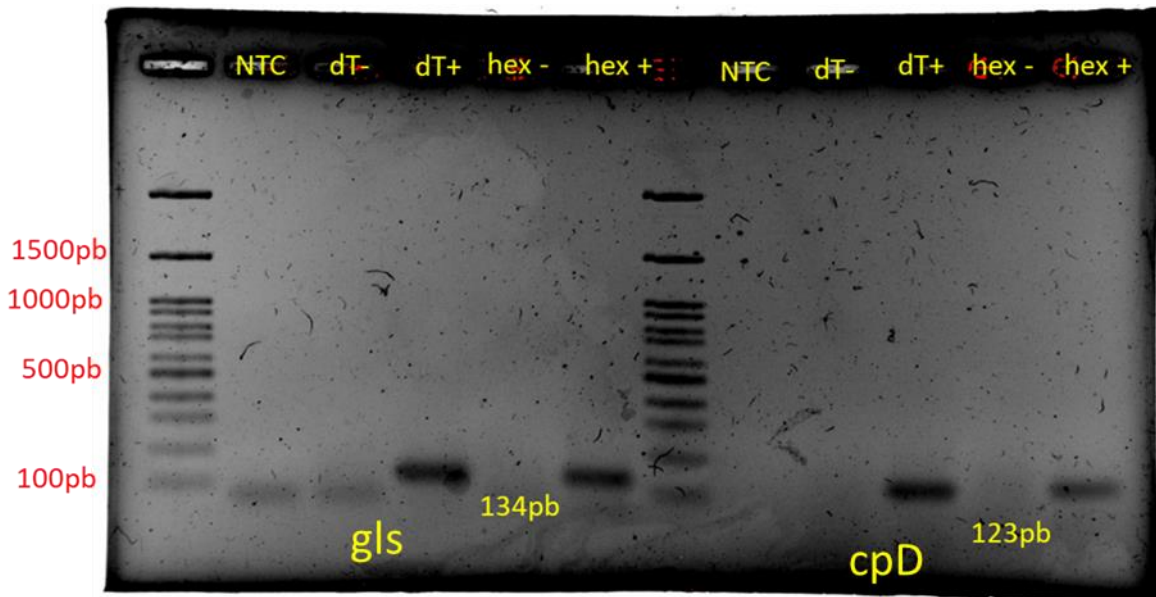


Figura 38. Prueba de oligos para los genes *gls* y *cpD*.

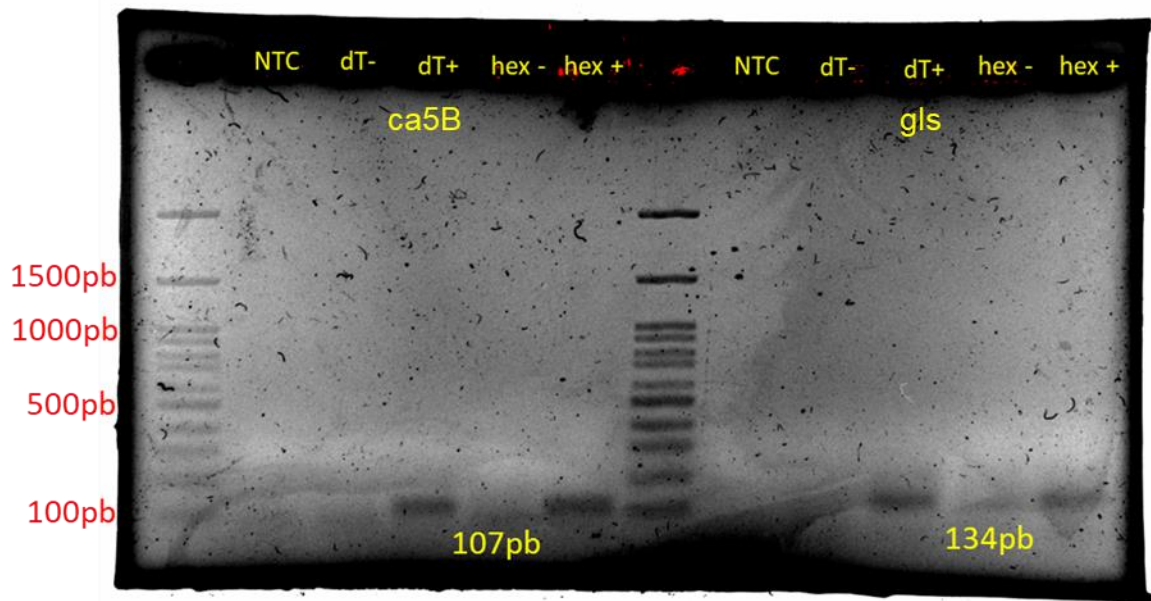


Figura 39. Prueba de oligos para los genes *ca5B* y *gls*.

En la Figura 40 se muestra la prueba de oligonucleótidos realizada para tres genes de referencia propuestos. Si bien, en el gel de agarosa no se observan inespecificidades para los tres genes, al momento de realizar la curva estándar de estos por medio de RT-PCR los genes *rps16* y *actB* mostraron amplificación inespecífica de acuerdo con sus curvas de disociación (datos no mostrados), por lo que se descartaron para su uso.

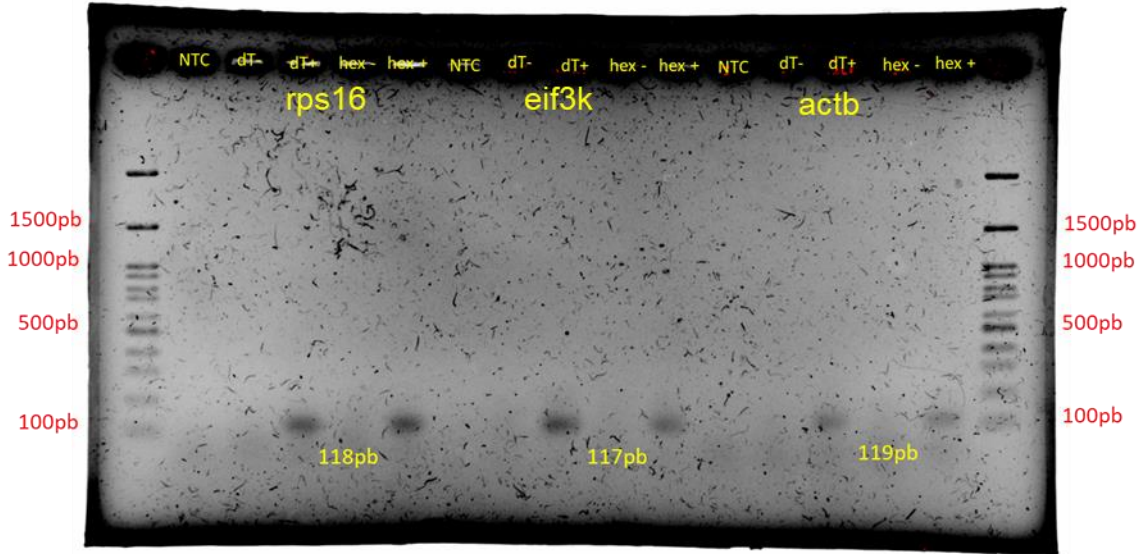


Figura 40. Prueba de oligos para los genes *rps16*, *eif3k* y *actB*.

12.7. Geles de agarosa para ARN total

La integridad del ARN extraído y purificado se evaluó por medio de las relaciones 260/280 y 260/230, así como con geles de agarosa al 1.2%. En las Figuras 41 y 42 se muestran los geles de agarosa realizados para todas las muestras; 0.03, 5 y 20% de pCO₂, y 48 y 120 h de tiempo de cultivo, indicados como t₂ y t₅, respectivamente.

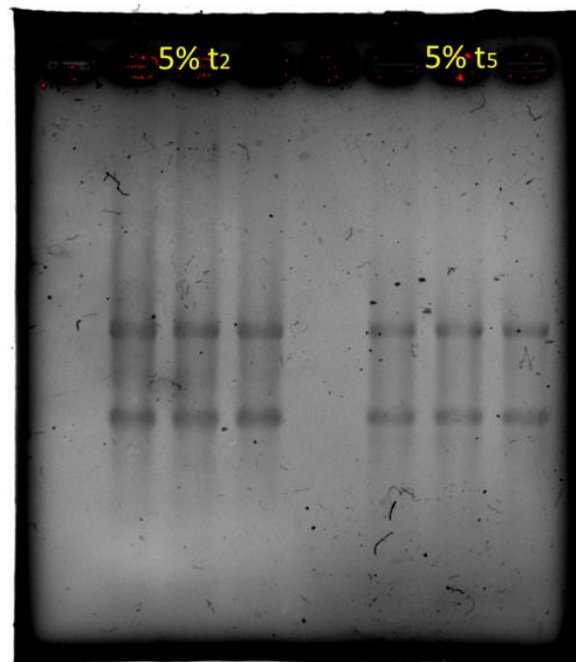


Figura 41. Gel de agarosa para ARN extraído de cultivos a 5% de pCO₂.

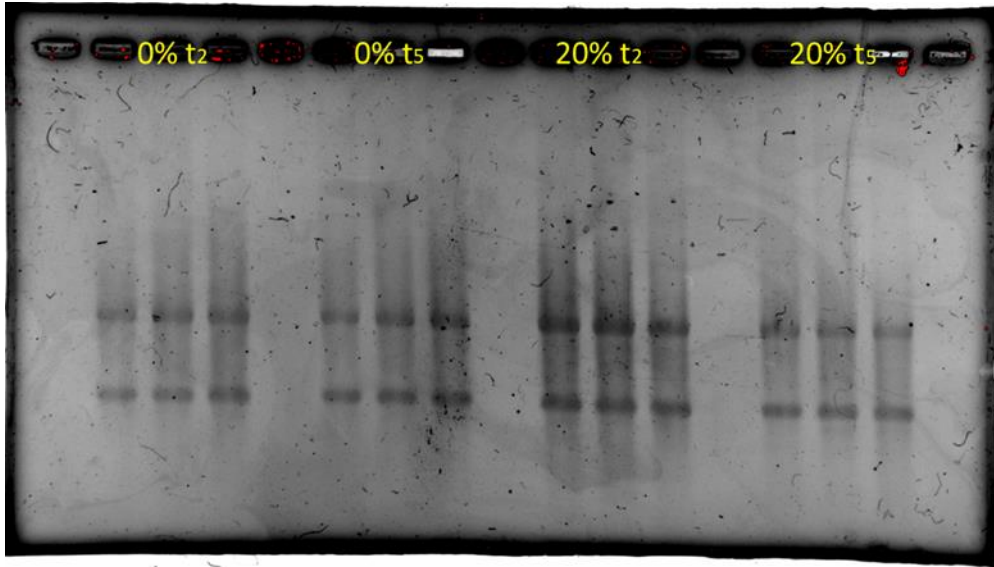


Figura 42. Gel de agarosa para ARN extraído de cultivos a 0.03 y 20% de pCO₂.

12.8. Curvas de RT-qPCR

A continuación, se presentan las curvas estándar, de amplificación y de disociación para todos los genes evaluados incluyendo el gen de referencia (*eif3K*).

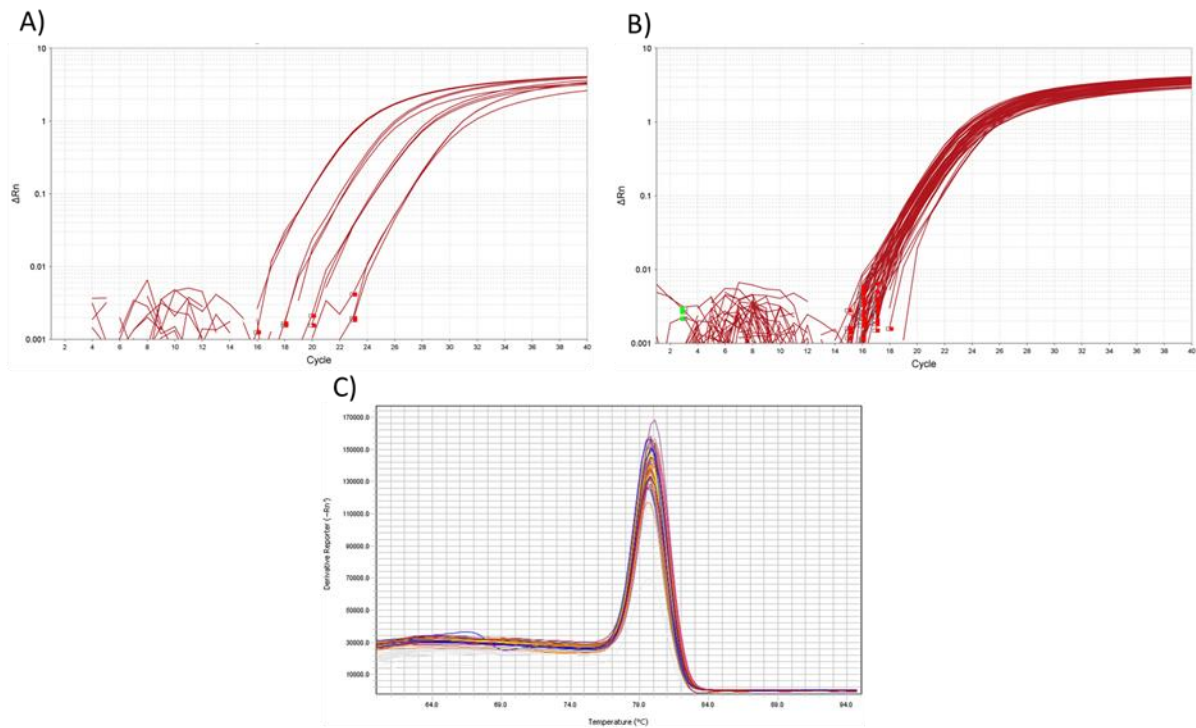


Figura 43. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen *eif3K*. A) Curva estándar, B) curva de amplificación y C) curva de disociación.

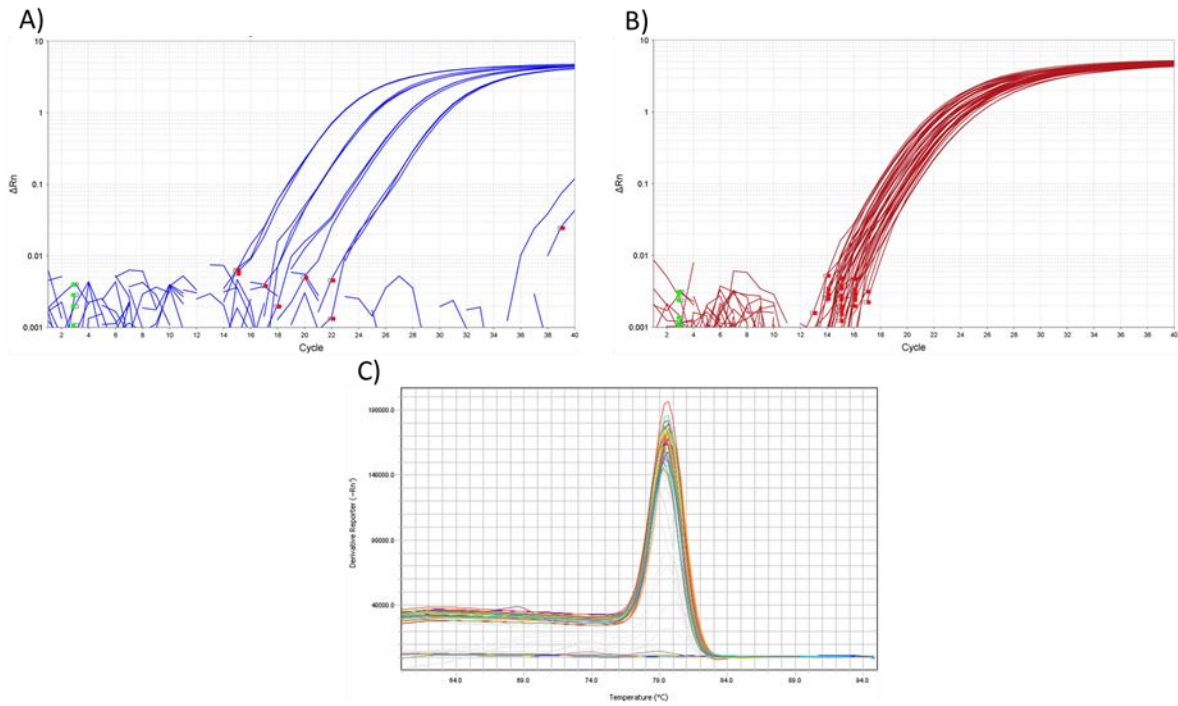


Figura 44. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen *IdhA*. A) Curva estándar, B) curva de amplificación y C) curva de disociación.

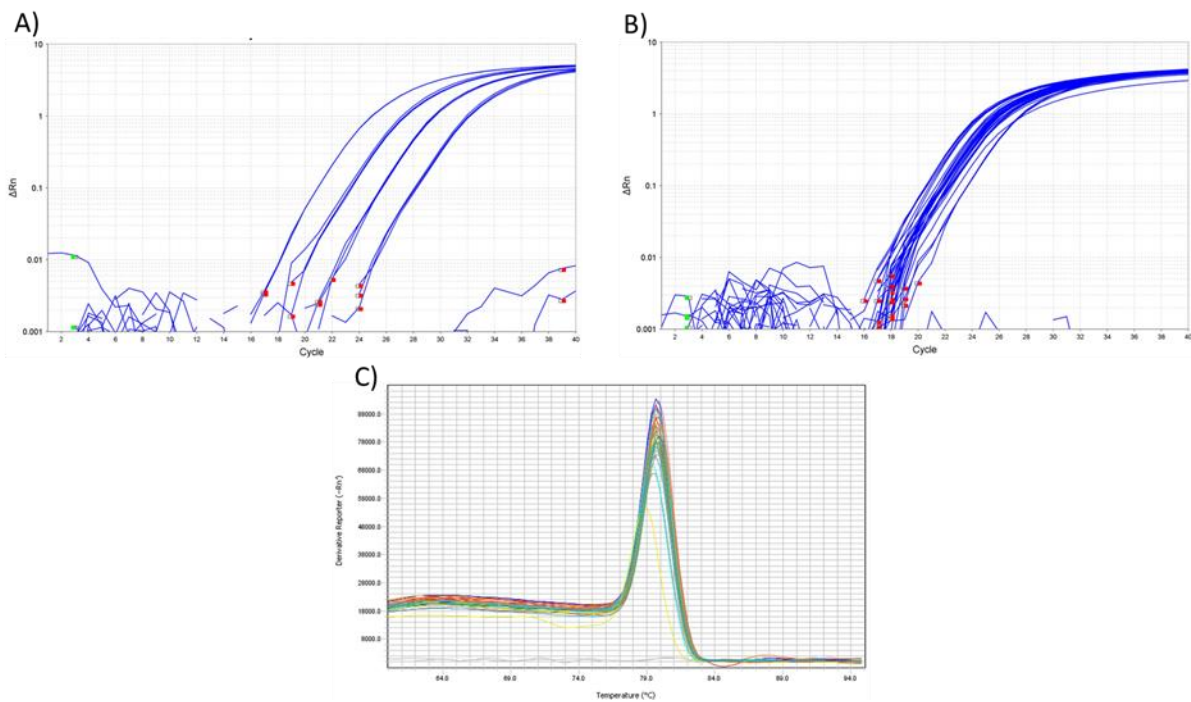


Figura 45. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen *gls*. A) Curva estándar, B) curva de amplificación y C) curva de disociación.

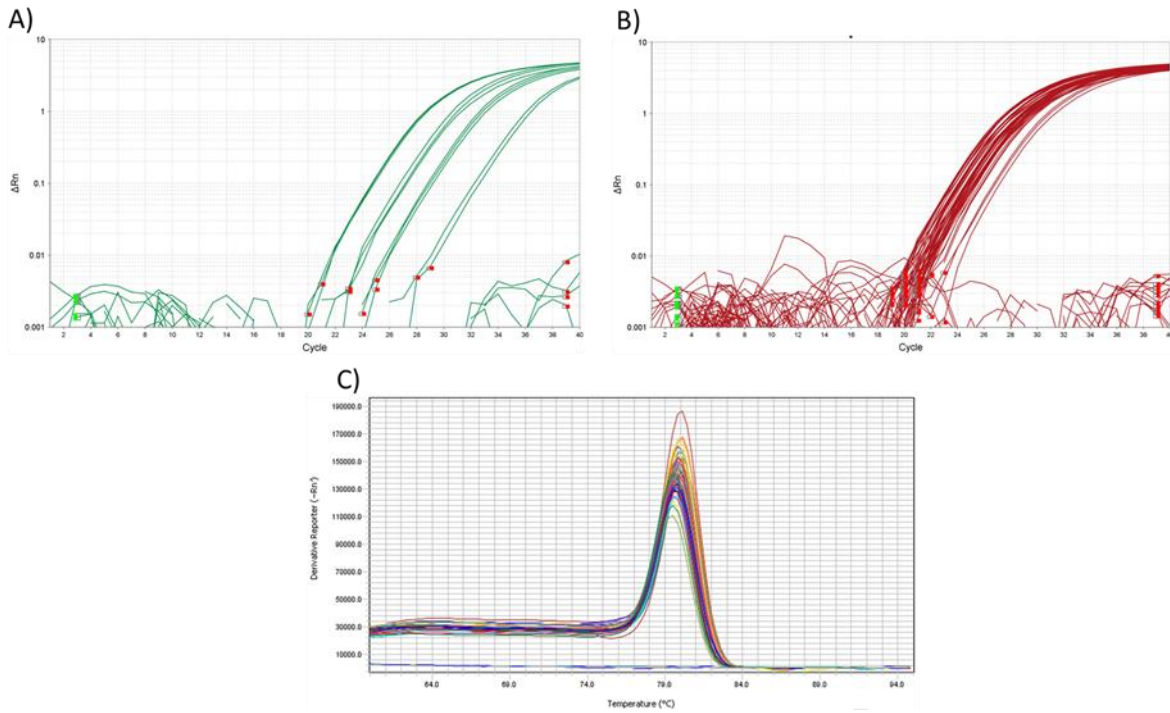


Figura 46. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen *ca5B*. A) Curva estándar, B) curva de amplificación y C) curva de disociación.

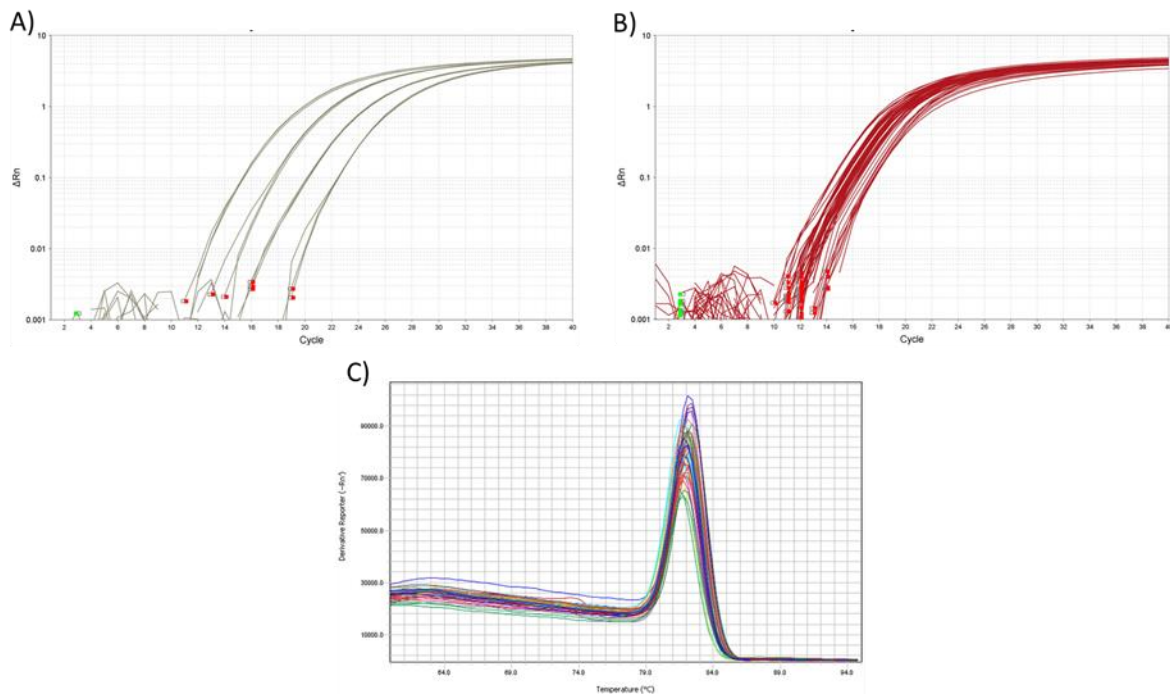


Figura 47. Curvas de RT-PCR obtenidas para el transgén de la cadena pesada del AcM. A) Curva estándar, B) curva de amplificación y C) curva de disociación.

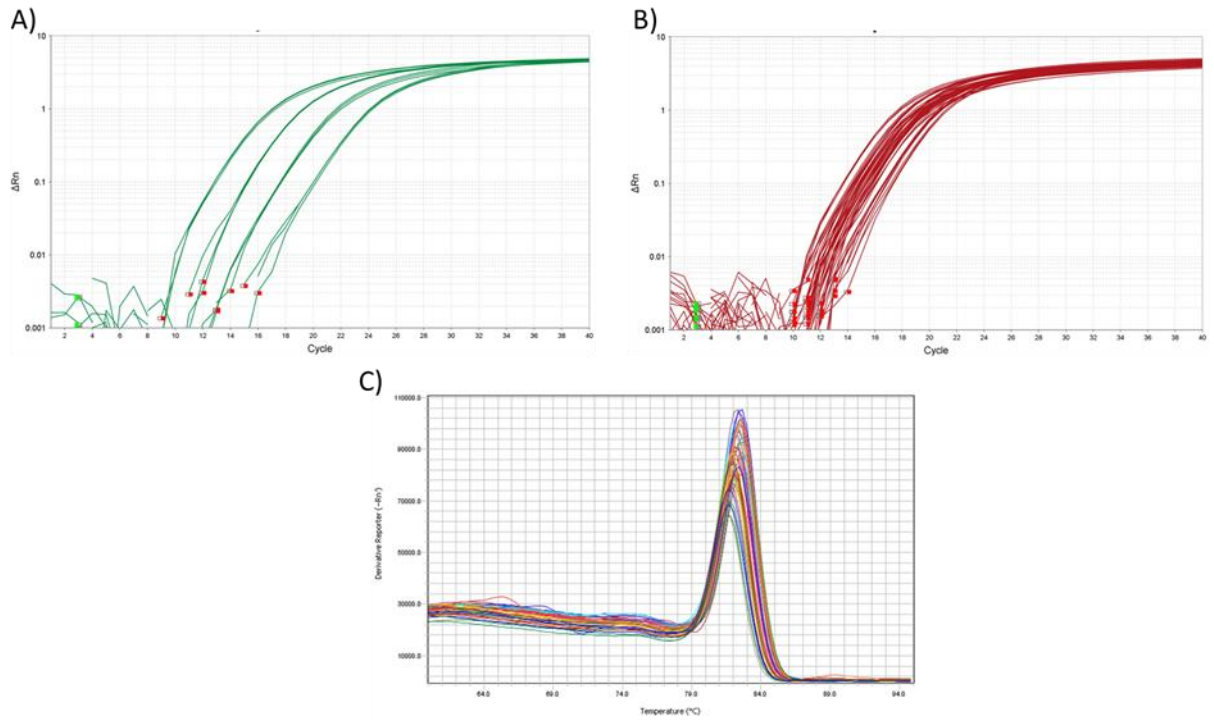


Figura 48. Curvas de RT-PCR obtenidas para el transgén de la cadena ligera del AcM. A) Curva estándar, B) curva de amplificación y C) curva de disociación.

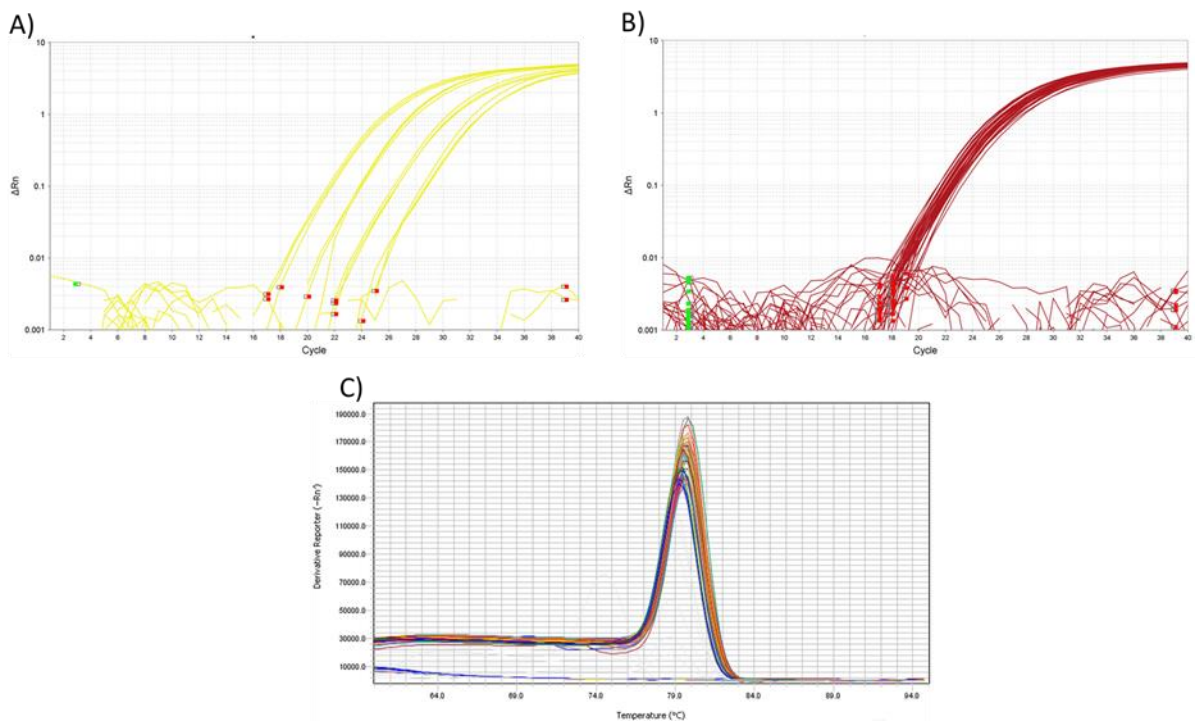


Figura 49. Curvas de RT-PCR obtenidas para el gen cpD. A) Curva estándar, B) curva de amplificación y C) curva de disociación.

13. REFERENCIAS

- Aguilera, J., Petit, T., de Winde, J. H., & Pronk, J. T. (2005). Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Research*, 5(6–7), 579–593.
<https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.009>
- Ahleboot, Z., Khorshidtalab, M., Motahari, P., Mahboudi, R., Arjmand, R., Mekarizadeh, A., & Maleknia, S. (2021). Designing a strategy for pH control to improve CHO cell productivity in bioreactor. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 13(3), 123–130.
<https://doi.org/10.18502/ajmb.v13i3.6365>
- Amores-Sánchez, M. I., & Medina, M. A. (1999). Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Molecular Genetics and Metabolism*, 67(2), 100–105.
<https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2857>
- Ansar, W., & Ghosh, S. (2013). Monoclonal antibodies: A tool in clinical research. *Indian Journal of Clinical Medicine*, 4, IJCM.S11968. <https://doi.org/10.4137/IJCM.S11968>
- Azzam, Z. S., Sharabi, K., Guetta, J., Bank, E. M., & Gruenbaum, Y. (2010). The physiological and molecular effects of elevated CO₂ levels. *Cell Cycle*, 9(8), 1528–1532.
<https://doi.org/10.4161/cc.9.8.11196>
- Baez, A., Flores, N., Bolívar, F., & Ramírez, O. T. (2009). Metabolic and transcriptional response of recombinant *Escherichia coli* to elevated dissolved carbon dioxide concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(1), 102–110. <https://doi.org/10.1002/bit.22379>
- Bahr, S. M., Borgschulte, T., Kayser, K. J., & Lin, N. (2009). Using microarray technology to select housekeeping genes in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(5), 1041–1046. <https://doi.org/10.1002/bit.22452>
- Becker, M., Junghans, L., Teleki, A., Bechmann, J., & Takors, R. (2019). The less the better: how suppressed base addition boosts production of monoclonal antibodies with Chinese hamster ovary cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 76.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00076>
- Blombach, B., & Takors, R. (2015). CO₂ - Intrinsic product, essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 108. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00108>
- Bonar, P. T., & Casey, J. R. (2008). Plasma membrane Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers: structure, mechanism and physiology. *Channels*, 2(5), 337–345.
<https://doi.org/10.4161/chan.2.5.6899>

- Boron, W. F. (2010). Evaluating the role of carbonic anhydrases in the transport of HCO_3^- -related species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(2), 410–421.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.021>
- Boron, W. F., Endeward, V., Gros, G., Musa-Aziz, R., & Pohl, P. (2011). Intrinsic CO_2 permeability of cell membranes and potential biological relevance of CO_2 channels. *European journal of chemical physics and physical chemistry*, 12 (5), pp. 1017–1019.
<https://doi.org/10.1002/cphc.201100034>
- Boswell, C. A., Tesar, D. B., Mukhyala, K., Theil, F.-P., Fielder, P. J., & Khawli, L. A. (2010). Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. *Bioconjugate Chemistry*, 21(12), 2153–2163. <https://doi.org/10.1021/bc100261d>
- Brunengraber, H., & Roe, C. R. (2006). Anaplerotic molecules: current and future. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2–3), 327–331. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0320-1>
- Brunner, M., Doppler, P., Klein, T., Herwig, C., & Fricke, J. (2018). Elevated pCO_2 affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes. *Engineering in Life Sciences*, 18(3), 204–214. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700131>
- Brunner, M., Fricke, J., Kroll, P., & Herwig, C. (2017). Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH , pO_2 and pCO_2) on CHO batch performance and critical quality attributes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(2), 251–263.
<https://doi.org/10.1007/s00449-016-1693-7>
- Bulté, D. B., Palomares, L. A., Parra, C. G., Martínez, J. A., Contreras, M. A., Noriega, L. G., & Ramírez, O. T. (2020). Overexpression of the mitochondrial pyruvate carrier reduces lactate production and increases recombinant protein productivity in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(9), 2633–2647.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.27439>
- Casey, J. R. (2006). Why bicarbonate? *Biochemistry and Cell Biology*, 84(6), 930–939.
<https://doi.org/10.1139/o06-184>
- Chung, S., Tian, J., Tan, Z., Chen, J., Zhang, N., Huang, Y., Vandermark, E., Lee, J., Borys, M., & Li, Z. J. (2019). Modulating cell culture oxidative stress reduces protein glycation and acidic charge variant formation. *MAbs*, 11(1), 205–216.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1537533>
- Cordat, E., & Casey, J. R. (2009). Bicarbonate transport in cell physiology and disease. *The Biochemical Journal*, 417(2), 423–439. <https://doi.org/10.1042/BJ20081634>
- Cummins, E. P., Strowitzki, M. J., & Taylor, C. T. (2020). Mechanisms and consequences of oxygen and carbon dioxide sensing in mammals. *Physiological Reviews*, 100(1), 463–488.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2019>

- Darja, O., Stanislav, M., Saša, S., Andrej, F., Lea, B., & Branka, J. (2016). Responses of CHO cell lines to increased pCO₂ at normal (37 °C) and reduced (33 °C) culture temperatures. *Journal of Biotechnology*, 219, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.12.013>
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., & Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19345–19350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>
- Dick, L. W. J., Qiu, D., Mahon, D., Adamo, M., & Cheng, K.-C. (2008). C-terminal lysine variants in fully human monoclonal antibodies: investigation of test methods and possible causes. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(6), 1132–1143. <https://doi.org/10.1002/bit.21855>
- Dong, B., Zhang, X., Fan, Y., Cao, S., & Zhang, X. (2018). Acidosis promotes cell apoptosis through the G protein-coupled receptor 4/CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein pathway. *Oncology Letters*, 16(5), 6735–6741. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9478>
- 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>
- Dubey, A., Lakshminarayana, L., Sadananda, D., Gouthami, K., .. E., Singh, A., Singh, A., & Singh, A. (2021). Inferences of carbon dioxide in present-day cell culture systems: An unacknowledged problem and perspectives. *Austin Therapeutics*, 6. <https://doi.org/10.26420/austintherapeutics.2021.1033>
- Endeward, V., Arias-Hidalgo, M., Al-Samir, S., & Gros, G. (2017). CO₂ permeability of biological membranes and role of CO₂ Channels. *Membranes*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/membranes7040061>
- Enns, T. (1967). Facilitation by carbonic anhydrase of carbon dioxide transport. *Science*, 155(3758), 44–47. <https://doi.org/10.1126/science.155.3758.44>
- Eon-Duval, A., Broly, H., & Gleixner, R. (2012). Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: An assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnology Progress*, 28(3), 608–622. <https://doi.org/10.1002/btpr.1548>
- Erb, T. J. (2011). Carboxylases in natural and synthetic microbial pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24), 8466–8477. <https://doi.org/10.1128/AEM.05702-11>
- Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Viteri, G., Marin-Garcia, P., Ping, P., Stein, L., D'Eustachio, P., &

- Hermjakob, H. (2018). Reactome diagram viewer: data structures and strategies to boost performance. *Bioinformatics*, *34*(7), 1208–1214.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx752>
- Flinck, M., Kramer, S. H., & Pedersen, S. F. (2018). Roles of pH in control of cell proliferation. *Acta Physiologica*, *223*(3), e13068. <https://doi.org/10.1111/apha.13068>
- Follonier, S., Escapa, I. F., Fonseca, P. M., Henes, B., Panke, S., Zinn, M., & Prieto, M. A. (2013). New insights on the reorganization of gene transcription in *Pseudomonas putida* KT2440 at elevated pressure. *Microbial Cell Factories*, *12*, 30. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-30>
- Fu, T., Zhang, C., Jing, Y., Jiang, C., Li, Z., Wang, S., Ma, K., Zhang, D., Hou, S., Dai, J., Kou, G., & Wang, H. (2016). Regulation of cell growth and apoptosis through lactate dehydrogenase C over-expression in Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(11), 5007–5016. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7348-4>
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., & Onishi, S. (1999). Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. cDNA cloning, mRNA expression, subcellular localization, and mapping to chromosome x. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(30), 21228–21233. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21228>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, *25*(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- García Merino, A. (2011). Monoclonal antibodies. Basic features. *Neurología (English Edition)*, *26*(5), 301–306. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2173-5808\(11\)70063-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2173-5808(11)70063-3)
- Gramer, M. J. (2000). Detecting and minimizing glycosidase activities that can hydrolyze sugars from cell culture-produced glycoproteins. *Molecular Biotechnology*, *15*(1), 69–75. <https://doi.org/10.1385/MB:15:1:69>
- Gramer, M. J., & Goochee, C. F. (1993). Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnology Progress*, *9*(4), 366–373. <https://doi.org/10.1021/bp00022a003>
- Gray, D. R., Chen, S., Howarth, W., Inlow, D., & Maiorella, B. L. (1996). CO₂ in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture. *Cytotechnology*, *22*(1–3), 65–78. <https://doi.org/10.1007/BF00353925>

- Guais, A., Brand, G., Jacquot, L., Karrer, M., Dukan, S., Grévillet, G., Molina, T. J., Bonte, J., Regnier, M., & Schwartz, L. (2011). Toxicity of carbon dioxide: a review. *Chemical Research in Toxicology*, 24(12), 2061–2070. <https://doi.org/10.1021/tx200220r>
- Hartley, F., Walker, T., Chung, V., & Morten, K. (2018). Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(8), 1890–1903. <https://doi.org/10.1002/bit.26603>
- Head, P. E., & Venditti, C. P. (2023). Anaplerosis in action. *Nature Metabolism*, 5(1), 5–7. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00724-4>
- Hu, Z., Zhang, H., Haley, B., Macchi, F., Yang, F., Misaghi, S., Elich, J., Yang, R., Tang, Y., Joly, J. C., Snedecor, B. R., & Shen, A. (2016). Carboxypeptidase D is the only enzyme responsible for antibody C-terminal lysine cleavage in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(10), 2100–2106. <https://doi.org/10.1002/bit.25977>
- Jagschies, G. (2018). Brief review of the biopharmaceutical and vaccine industry. *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes* (pp. 33–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00002-5>
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress*, 21(1), 11–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bp040016j>
- Jenkins, N., Murphy, L., & Tyther, R. (2008). Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Molecular Biotechnology*, 39(2), 113–118. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9049-4>
- Jennewein, M. F., & Alter, G. (2017). The immunoregulatory roles of antibody glycosylation. *Trends in Immunology*, 38(5), 358–372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.it.2017.02.004>
- Jozala, A. F., Geraldles, D. C., Tundisi, L. L., Feitosa, V. de A., Breyer, C. A., Cardoso, S. L., Mazzola, P. G., Oliveira-Nascimento, L. de, Rangel-Yagui, C. de O., Magalhães, P. de O., Oliveira, M. A. de, & Pessoa, A. (2016). Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 51–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007>
- Jungmann, R. A., Huang, D., & Tian, D. (1998). Regulation of LDH-A gene expression by transcriptional and posttranscriptional signal transduction mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 282(1–2), 188–195. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(199809/10\)282:1/2<188::AID-JEZ21>3.0.CO;2-P](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(199809/10)282:1/2<188::AID-JEZ21>3.0.CO;2-P)

- 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.-H., Quan, C., Joshi, A., Harris, R. J., & Motchnik, P. (2010). Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *MAbs*, 2(6), 613–624. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13333>
- Kimura, R., & Miller, W. M. (1996). Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(1), 152–160. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19961005\)52:1<152::AID-BIT15>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19961005)52:1<152::AID-BIT15>3.0.CO;2-Q)
- Kimura, R., & Miller, W. M. (1997). Glycosylation of CHO-derived recombinant tPA produced under elevated pCO₂. *Biotechnology Progress*, 13(3), 311–317. <https://doi.org/10.1021/bp9700162>
- Kosuda, M., Yamaguchi, S., Nagasawa, A., Yamana, M., Koike, M., Nishioka, H., & Ishihara, H. (2019). 2179-P: Overexpression screening identifies mitochondrial carbonic anhydrase 5B as an important regulator of glucose-stimulated insulin secretion in beta cells. *Diabetes*, 68(Supplement_1), 2179-P. <https://doi.org/10.2337/db19-2179-P>
- Lagadic-Gossmann, D., Huc, L., & Lecreur, V. (2004). Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death & Differentiation*, 11(9), 953–961. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401466>
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(1), 21–39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>
- Li, X., Yang, Y., Zhang, B., Lin, X., Fu, X., An, Y., Zou, Y., Wang, J.-X., Wang, Z., & Yu, T. (2022). Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 305. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01151-3>
- Liste-Calleja, L., Lecina, M., Lopez-Repullo, J., Albiol, J., Solà, C., & Cairó, J. J. (2015). Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(23), 9951–9960. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6855-z>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lukey, M. J., Greene, K. S., Erickson, J. W., Wilson, K. F., & Cerione, R. A. (2016). The oncogenic transcription factor c-Jun regulates glutaminase expression and sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy. *Nature Communications*, 7, 11321.

<https://doi.org/10.1038/ncomms11321>

- Luo, J., Zhang, J., Ren, D., Tsai, W.-L., Li, F., Amanullah, A., & Hudson, T. (2012). Probing of C-terminal lysine variation in a recombinant monoclonal antibody production using Chinese hamster ovary cells with chemically defined media. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(9), 2306–2315. <https://doi.org/10.1002/bit.24510>
- Ma, X., Zhang, L., Zhang, L., Wang, C., Guo, X., Yang, Y., Wang, L., Li, X., & Ma, N. (2020). Validation and identification of reference genes in Chinese hamster ovary cells for Fc-fusion protein production. *Experimental Biology and Medicine*, *245*(8), 690–702. <https://doi.org/10.1177/1535370220914058>
- Mafra, A. C. P., & Dias, S. M. G. (2019). Several faces of glutaminase regulation in cells. *Cancer Research*, *79*(7), 1302–1304. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0313>
- Mahmuda, A., Bande, F., Al-Zihiry, K. J. K., Abdulhaleem, N., Majid, R. A., Hamat, R. A., Abdullah, W. O., & Unyah, Z. (2017). Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *16*, 713–722.
- Maier, U., & Büchs, J. (2001). Characterisation of the gas–liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, *7*(2), 99–106. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00107-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00107-8)
- Maniarasu, R., & Mohan Kumar, R. (2022). A mini-review on CO₂ role in cell culture and medicinal applications. *Journal of Cell Science and Therapy*, *13*(346). <https://doi.org/10.35248/2157-7013.22.13.346>
- Martinelle, K., & Häggström, L. (1993). Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. *Journal of Biotechnology*, *30*(3), 339–350. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90148-g](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90148-g)
- Mastrangeli, R., Audino, M. C., Palinsky, W., Broly, H., & Bierau, H. (2020). The formidable challenge of controlling high mannose-type N-glycans in therapeutic mAbs. *Trends in Biotechnology*, *38*(10), 1154–1168. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.05.009>
- Mathupala, S. P., Colen, C. B., Parajuli, P., & Sloan, A. E. (2007). Lactate and malignant tumors: A therapeutic target at the end stage of glycolysis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *39*(1), 73–77. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9062-x>
- Morrow, K. J., & Langer, E. S. (2019). *A biopharma year in review — And a look ahead to 2020*.
- Mostafa, S. S., & Gu, X. (2003). Strategies for improved dCO₂ removal in large-scale fed-batch cultures. *Biotechnology Progress*, *19*(1), 45–51. <https://doi.org/10.1021/bp0256263>
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2014). *Lehninger principios de bioquímica*. En

Principios de bioquímica (6a. ed.). Omega.

- Oliveira, J. E., Damiani, R., Vorauer-Uhl, K., Bartolini, P., & Ribela, M. T. C. P. (2008). Influence of a reduced CO₂ environment on the secretion yield, potency and N-glycan structures of recombinant thyrotropin from CHO cells. *Molecular Biotechnology*, 39(2), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9047-6>
- Owen, C. S., Pooler, P. M., Wahl, M. L., Coss, R. A., & Leeper, D. B. (1997). Altered proton extrusion in cells adapted to growth at low extracellular pH. *Journal of Cellular Physiology*, 173(3), 397–405. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199712\)173:3<397::AID-JCP12>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199712)173:3<397::AID-JCP12>3.0.CO;2-9)
- Özkaya, A. B., & Geyik, C. (2022). From viability to cell death: Claims with insufficient evidence in high-impact cell culture studies. *PLOS ONE*, 17(2), e0250754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250754>
- Patlak, M. (2009). Magic bullets and monoclonals: An antibody tale. *Breakthroughs in Bioscience*. <https://www.margiepatlak.com/MAB-FASEB.pdf>
- Pereira, S., Kildegaard, H. F., & Andersen, M. R. (2018). Impact of CHO metabolism on cell growth and protein production: An overview of toxic and inhibiting metabolites and nutrients. *Biotechnology Journal*, 13(3), e1700499. <https://doi.org/10.1002/biot.201700499>
- Phelan, D. E., Mota, C., Lai, C., Kierans, S. J., & Cummins, E. P. (2021). Carbon dioxide-dependent signal transduction in mammalian systems. *Interface Focus*, 11(2), 20200033. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2020.0033>
- Poole, R. C., & Halestrap, A. P. (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *The American Journal of Physiology*, 264(4 Pt 1), C761–82. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.4.C761>
- Quinn, W. J. 3rd, Jiao, J., TeSlaa, T., Stadanlick, J., Wang, Z., Wang, L., Akimova, T., Angelin, A., Schäfer, P. M., Cully, M. D., Perry, C., Kopinski, P. K., Guo, L., Blair, I. A., Ghanem, L. R., Leibowitz, M. S., Hancock, W. W., Moon, E. K., Levine, M. H., ... Beier, U. H. (2020). Lactate Limits T Cell Proliferation via the NAD(H) Redox State. *Cell Reports*, 33(11), 108500. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108500>
- Rader, R. A. (2008). (Re)defining biopharmaceutical. *Nature Biotechnology*, 26(7), 743–751. <https://doi.org/10.1038/nbt0708-743>
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle Real-Time PCR* (pp. 21–34). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3
- Rayasam, S., Dudhgaonkar, S., Deshmukh, P., Sarda, S., Kinge, P., & Hire, R. (2013). Monoclonal antibodies in therapeutics. *Asian Journal of Biomedical & Pharmaceutical*

Sciences, 3(19), 35–39.

- Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., & Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *Journal of Cellular Physiology*, 220(1), 144–154.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21744>
- Román, R., Farràs, M., Camps, M., Martínez-Monge, I., Comas, P., Martínez-Espelt, M., Lecina, M., Casablanca, A., & Cairó, J. J. (2018). Effect of continuous feeding of CO₂ and pH in cell concentration and product titers in hIFN γ producing HEK293 cells: Induced metabolic shift for concomitant consumption of glucose and lactate. *Journal of Biotechnology*, 287, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.10.005>
- Romanova, N., & Noll, T. (2018). Engineered and natural promoters and chromatin-modifying elements for recombinant protein expression in CHO cells. *Biotechnology Journal*, 13(3), e1700232. <https://doi.org/10.1002/biot.201700232>
- Ryu, J. K., Kim, H. S., & Nam, D. H. (2012). Current status and perspectives of biopharmaceutical drugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(5), 900–911.
<https://doi.org/10.1007/s12257-012-0095-1>
- Sander, R. (2015). Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmos. Chem. Phys.*, 15(8), 4399–4981. <https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015>
- Santos, M. L. dos, Quintilio, W., Manieri, T. M., Tsuruta, L. R., & Moro, A. M. (2018). Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 54). scielo .
- Schellenberg, J., Nagraik, T., Wohlenberg, O. J., Ruhl, S., Bahnemann, J., Scheper, T., & Solle, D. (2022). Stress-induced increase of monoclonal antibody production in CHO cells. *Engineering in Life Sciences*, 22(5), 427–436.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elsc.202100062>
- Schmelzer, A. E., & Miller, W. M. (2002). Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. *Biotechnology Progress*, 18(2), 346–353. <https://doi.org/10.1021/bp010187d>
- Schneider, M., Marison, I. W., & von Stockar, U. (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology*, 46(3), 161–185.
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00196-4](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00196-4)
- Sekhon, B. S. (2010). Biopharmaceuticals: An overview. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(3), 1–19.
- Shigemura, M., Lecuona, E., Angulo, M., Dada, L. A., Edwards, M. B., Welch, L. C., Casalino-

- Matsuda, S. M., Sporn, P. H. S., Vadász, I., Helenius, I. T., Nader, G. A., Gruenbaum, Y., Sharabi, K., Cummins, E., Taylor, C., Bharat, A., Gottardi, C. J., Beitel, G. J., Kaminski, N., ... Sznajder, J. I. (2019). Elevated CO₂ regulates the Wnt signaling pathway in mammals, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 9(1), 18251. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54683-0>
- Shigemura, M., Welch, L. C., & Sznajder, J. I. (2020). Hypercapnia regulates gene expression and tissue function. *Frontiers in Physiology*, 11, 598122. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.598122>
- Sieblist, C., Hägeholz, O., Aehle, M., Jenzsch, M., Pohlscheidt, M., & Lübbert, A. (2011). Insights into large-scale cell-culture reactors: II. Gas-phase mixing and CO₂ stripping. *Biotechnology Journal*, 6(12), 1547–1556. <https://doi.org/10.1002/biot.201100153>
- Singh, S., Kumar, N. K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P., & Chugh, V. K. (2018). Monoclonal antibodies: A review. *Current Clinical Pharmacology*, 13(2), 85–99. <https://doi.org/10.2174/1574884712666170809124728>
- Spearman, M., Dionne, B., & Butler, M. (2011). The role of glycosylation in therapeutic antibodies. *Antibody Expression and Production* (pp. 251–292). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1257-7_12
- Sterling, D., Reithmeier, R. A., & Casey, J. R. (2001). Carbonic anhydrase: in the driver's seat for bicarbonate transport. *JOP: Journal of the Pancreas*, 2(4 Suppl), 165–170.
- Stretton, S., & Goodman, A. E. (1998). Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 79–85. <https://doi.org/10.1023/A:1000610225458>
- Takuma, S., Hirashima, C., & Piret, J. M. (2007). Dependence on glucose limitation of the pCO₂ influences on CHO cell growth, metabolism and IgG production. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(6), 1479–1488. <https://doi.org/10.1002/bit.21376>
- Tang, H., Miao, S., Zhang, X., Fan, L., Liu, X., Tan, W.-S., & Zhao, L. (2018). Insights into the generation of monoclonal antibody acidic charge variants during Chinese hamster ovary cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1203–1214. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8650-5>
- Taylor, C. T., & Cummins, E. P. (2011). Regulation of gene expression by carbon dioxide. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 4), 797–803. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201467>
- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J. D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(7), 2013–2024.

<https://doi.org/10.1002/bit.24858>

- 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.ibj.21.3.131>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
<https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Veglio, F., Beolchini, F., & Ubaldini, S. (1998). Empirical models for oxygen mass transfer: a comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. *Process Biochemistry*, 33(4), 367–376.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00006-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00006-5)
- Villaseñor, F. (1998). *Evaluación de los sistemas enzimáticos glutamino sintetasa y glutamato deshidrogenasa para la eliminación de amonio del medio de cultivo de células de eucariotes superiores*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wahrheit, J., Nicolae, A., & Heinzle, E. (2013). Investigation of glutamine metabolism in CHO cells by dynamic metabolic flux analysis. *BMC Proceedings*, 7(Suppl 6), p. P44.
<https://doi.org/10.1186/1753-6561-7-S6-P44>
- Waldmann, T. A. (1991). Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science*, 252(5013), 1657–1662. <https://doi.org/10.1126/science.2047874>
- Walsh, G., & Walsh, E. (2022). Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature Biotechnology*, 40(12), 1722–1760. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>
- Wei, B., Gao, X., Cadang, L., Izadi, S., Liu, P., Zhang, H.-M., Hecht, E., Shim, J., Magill, G., Pabon, J. R., Dai, L., Phung, W., Lin, E., Wang, C., Whang, K., Sanchez, S., Oropeza, J. J., Camperi, J., Zhang, J., ... Jiang, G. (2021). Fc galactosylation follows consecutive reaction kinetics and enhances immunoglobulin G hexamerization for complement activation. *MAbs*, 13(1), 1893427. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1893427>
- Xie, P., Niu, H., Chen, X., Zhang, X., Miao, S., Deng, X., Liu, X., Tan, W.-S., Zhou, Y., & Fan, L. (2016). Elucidating the effects of pH shift on IgG1 monoclonal antibody acidic charge variant levels in Chinese hamster ovary cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24), 10343–10353. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7749-4>
- Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A hallmark of cancer metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19, 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
- Yang, Y., & Sauve, A. A. (2016). NAD(+) metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation

- for therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864(12), 1787–1800.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.014>
- Ying, M., You, D., Zhu, X., Cai, L., Zeng, S., & Hu, X. (2021). Lactate and glutamine support NADPH generation in cancer cells under glucose deprived conditions. *Redox Biology*, 46, 102065. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102065>
- Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., & Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(9), 1496–1516. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>
- Yoon, S. K., Ahn, Y. H., & Han, K. (2001). Enhancement of recombinant erythropoietin production in CHO cells in an incubator without CO₂ addition. *Cytotechnology*, 37(2), 119–132. <https://doi.org/10.1023/A:1019905319224>
- Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., & Wurm, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology*, 30(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.021>
- Zanghi, J. A., Schmelzer, A. E., Mendoza, T. P., Knop, R. H., & Miller, W. M. (1999). Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO₂ or pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(2), 182–191. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19991020\)65:2<182::aid-bit8>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19991020)65:2<182::aid-bit8>3.0.co;2-d)
- Zhang, Z.-X., Gan, I., Pavlosky, A., Huang, X., Fuhrmann, B., & Jevnikar, A. M. (2017). Intracellular pH regulates tRAIL-induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells. *Journal of Immunology Research*, 2017, 1503960. <https://doi.org/10.1155/2017/1503960>
- Zhu, M. M., Goyal, A., Rank, D. L., Gupta, S. K., Vanden Boom, T., & Lee, S. S. (2005). Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: A case study. *Biotechnology Progress*, 21(1), 70–77.
<https://doi.org/10.1021/bp049815s>