



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

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

**IMPACTO DE LAS HETEROGENEIDADES
MEDIOAMBIENTALES SOBRE LA GLICOSILACIÓN DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES PRODUCIDOS POR
CULTIVO *IN VITRO* DE HIBRIDOMAS**

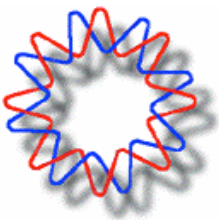
T E S I S

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

P R E S E N T A

M. en C. José Antonio Serrato Pérez

DIRECTOR DE TESIS: Dr. O. Tonatiuh Ramírez Reivich



Cuernavaca, Morelos. Diciembre 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fué realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca para estudios de doctorado CONACyT 144901. Además se contó con el apoyo económico de los proyectos CONACyT-CB-2008-01-104951, DGAPA IN-216100 y DGAPA IX-254404.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. O. Tonatiuh Ramírez por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su paciencia y sabios consejos.

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

Dr. Alejandro Alagón
Dr. Fernando Esquivel

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

Dr. Iván Martínez Duncker
Dr. Jorge Paniagua Solís
Dr. Mario Moisés Alvarez
Dra. Patricia Gorocica Rosete
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez

A los Doctores Laura Palomares, Sandino Estrada, Angélica Meneses por sus valiosos consejos e importante apoyo académico.

A la M. en C. Vanessa Hernández, Lic. Karin Levi, B.A. Dip. Lib. Shirley Ainsworth, Lic. Alma Martínez Valle y Lic. Juan Manuel Hurtado por su importante asistencia técnica y académica.

Al Sr. Javier Dorantes por su asistencia en el laboratorio.

A Gloria Villa y Maribel Velazco por su asistencia en la unidad de docencia.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio lo que me han acompañado a lo largo de esta etapa de mi vida. Ellos saben quienes son.

A mis queridos amigos Almita Valle y Ernesto Esquivel.

A la familia.

DEDICATORIA

*Para mi querida esposa Vanessa. Esta tesis es nuestra.
Gracias.*

INDICE GENERAL

1	Indice de Figuras	1
2	Indice de Tablas	5
3	Abreviaturas	6
4	Resumen	9
5	Introducción	13
6	Antecedentes	17
6.1	Situación actual de la producción de AcM terapéuticos	17
6.2	Importancia del OD, pH y pCO ₂ en la glicosilación de los AcM y en el desempeño de los cultivos de hibridomas	19
6.3	Causas de la formación de gradientes de OD, pH y pCO ₂ en cultivos de células animales	21
6.4	El escalamiento descendente y las evidencia de gradientes en cultivos de células animales	23
6.5	El proceso de glicosilación, la glicosilación en AcM y sus implicaciones en la actividad biológica	28
6.6	Implicaciones del medio de cultivo en la glicosilación de los AcM	32
7	Hipótesis	35
8	Objetivos	35
8.1	Objetivo general	35
8.2	Objetivos específicos	35
9	Materiales y Métodos	37
9.1	Modelo biológico	37
9.2	Medios de cultivo utilizados	37
9.3	Mantenimiento de células	39
9.3.1	Congelación	39
9.3.2	Descongelación	39
9.4	Adaptación del hibridoma BCF ₂ a crecer en medios de cultivo libres de suero	40

9.5	Inóculos	40
9.6	Estrategias de cultivo utilizadas	41
9.6.1	En el estudio de los efectos del medio de cultivo	41
9.6.2	En el estudio de los efectos de dCO ₂ y pH	41
9.7	Métodos analíticos	45
9.7.1	Cuantificación de la concentración celular	45
9.7.2	Determinación de la viabilidad celular	45
9.7.3	Cuantificación de la concentración de AcM en los cultivos	46
9.7.4	Cuantificación de la concentración de glucosa, lactato y glutamina	47
9.7.5	Purificación del AcM	48
9.7.6	Cuantificación de la concentración de AcM purificado	49
9.7.7	Determinación de la osmolalidad	49
9.8	Cálculo de los parámetros cinéticos y consideraciones matemáticas	50
9.8.1	Velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de producción de AcM y coeficientes metabólicos de glucosa, lactato y glutamina	50
9.9	Análisis de la micro y macroheterogeneidad de la glicosilación del AcM	51
9.9.1	Análisis por HPLC de Fase Normal	51
9.9.2	Nomenclatura de los oligosacáridos	57
9.9.3	Análisis por Electroforesis Capilar	58
9.10	Determinación de las actividades exoglicosidasas en sobrenadantes de cultivo	63
10	Resultados y Discusiones	65
10.1	Efecto de las oscilaciones de OD sobre el patrón de glicosilación del AcM producido por hibridoma BCF2 cultivado <i>in vitro</i> a diferentes periodos de oscilación	65
10.2	Efecto del pH y dCO ₂ constante y oscilante sobre el crecimiento, metabolismo y glicosilación del AcM	

	producido por cultivos <i>in vitro</i> del hibridoma BCF ₂	77
10.3	Desempeño del hibridoma BCF ₂ al cultivarse en medio SFM y CDM en comparación con DMEM-SFB: efecto en el crecimiento, metabolismo y patrón de glicosilación del AcM	101
II	Conclusiones	120
12	Referencias	123
13	Anexos	135
13.1	Análisis del patrón de N-glicosilación de AcM producido por cultivo del hibridoma BCF ₂ <i>in vivo</i>	
13.2	Programa de computadora del Sistema de Control y Adquisición de Datos del Sistema de Cultivo. Programa 1: Programa de control para cultivos a OD, pH y dCO ₂ en valores constantes. Programa 2: Programa de control para cultivos a OD, pH y dCO ₂ en perfiles oscilatorios.	
13.3	Publicaciones	

I. INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura cuaternaria de la molécula de IgG mostrando sus diferentes dominios y su oligosacárido.
- Figura 2. Biorreactor utilizado para el estudio de los efectos del dCO_2 y pH en valores tanto constantes como oscilantes.
- Figura 3. Perfil cromatográfico de la escalera de dextrana a 250 mM de formato de amonio en HPLC-Fase Normal.
- Figura 4. Curva para la conversión de tiempo de retención a unidades de glucosa utilizando 25 mM de formato de amonio en HPLC-Fase Normal.
- Figura 5. Curva para la conversión de tiempo de retención a unidades de glucosa utilizando 250 mM de formato de amonio en HPLC-Fase Normal.
- Figura 6. Migración de la escalera de dextrana por EC. El estándar de glicanos se introdujo hidrodinámicamente por 10 s a 3.45 kPa y la separación se realiza en polaridad reversa en un campo eléctrico constante de $515.4 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ a $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Los números representan el tiempo de migración de cada pico.
- Figura 7. Curva para la conversión de tiempo de migración a unidades de glucosa utilizando EC.
- Figura 8. Curva estándar de maltosa-APTS por EC. Cada pico representa una concentración de maltosa (1, 2, 3, 4 y 5 nmoles), mostrada en el recuadro.
- Figura 9. Perfiles cromatográficos a 25 mM de formato de amonio de los glicanos presentes en los AcM de las cinco condiciones evaluadas. Los números sobre los picos representan la estructura correspondiente de acuerdo a la Tabla 1.
- Figura 10. Digestiones con exoglicosidasas específicas de una muestra a OD oscilante con periodo de oscilación de 1600 s.

- Figura 11. Comparación entre los análisis cromatográficos de glicanos a 25 mM (línea continua) y 250 mM (línea punteada) de formato de amonio como fase móvil.
- Figura 12. Representación gráfica de las estructuras propuestas para los oligosacáridos presentes en el AcM BCF₂. El número a la derecha de cada estructura indica el número de pico, como se describe en la Tabla 1.
- Figura 13. Efecto de los gradientes de OD a los diferentes periodos de oscilación sobre los grupos de oligosacáridos que sufrieron mayor cambio.
- Figura 14. Cultivo representativo a pH y dCO₂ constante, en pH 7.2 y 170 mbar, respectivamente.
- Figura 15. Cultivos a pH y dCO₂ oscilantes. (A) Periodo de oscilación de 1800 s, (B) periodo de oscilación de 3600 s y (C) periodo de oscilación de 7200 s.
- Figura 16. Concentración celular y viabilidad de los cultivos a pH y dCO₂ constante. dCO₂ de 12 mbar (cuadros), dCO₂ de 50 mbar (rombos), dCO₂ de 170 mbar (círculos) y dCO₂ de 250 mbar (triángulos).
- Figura 17. Consumo y/o producción de metabolitos de los cultivos a pH y dCO₂ constante. dCO₂ de 12 mbar (cuadros), dCO₂ de 50 mbar (rombos), dCO₂ de 170 mbar (círculos) y dCO₂ de 250 mbar (triángulos).
- Figura 18. Concentración celular total (A), viable (B) y viabilidad (C) en los cultivos a pH y dCO₂ oscilante. Periodo de oscilación de 1800 s (cuadros), de 3600 s (rombos) y de 7200 s (círculos).
- Figura 19. Consumo y/o producción de metabolitos de los cultivos a pH y dCO₂ oscilante. Periodo de oscilación de 1800 s (cuadros), de 3600 s (rombos) y de 7200 s (círculos).
- Figura 20. Diámetro celular y osmolalidad del medio de cultivo en los cultivos a pH y dCO₂ constante (símbolos blancos) y oscilante (símbolos negros). dCO₂ de 12 mbar (cuadros), dCO₂ de 50 mbar

(rombos), $d\text{CO}_2$ de 170 mbar (círculos) y $d\text{CO}_2$ de 250 mbar (triángulos). Periodo de oscilación de 1800 s (cuadros), de 3600 s (rombos) y de 7200 s (círculos).

Figura 21. Electroferogramas por EC del patrón de glicosilación del AcM producido por cultivos del hibridoma BCF2 bajo condiciones de pH y $d\text{CO}_2$ constante (A - D) y oscilante (E - G).

Figura 22. Representación gráfica de las principales estructuras de oligosacáridos presentes en el AcM producido por el hibridoma BCF2 bajo condiciones de pH y $d\text{CO}_2$ constante y oscilante.

Figura 23. Crecimiento celular en medio de cultivo SFM, DMEM-SFB y CDM.

Figura 24. Cinéticas de consumo y producción de metabolitos y AcM en medio SFM, DMEM-SFB y CDM.

Figura 25. Actividades exoglicosidasas analizadas en el sobrenadante de los medios de cultivo SFM, DMEM-SFB y CDM.

Figura 26. Electroferogramas de los N-glicanos liberados del AcM producido en los tres diferentes medios de cultivo. (A) medio DMEM-SFB, (B) medio SFM y (C) medio CDM. Los números sobre los picos representan la estructura correspondiente de acuerdo a la Tabla 5.

Figura 27. Electroferogramas de las digestiones de los N-glicanos con exoglicosidasas del AcM producido en medio DMEM-SFB. (A) Muestra sin digerir. (B-F) Muestra digerida con sialidasa (B), β -galactosidasa (C), hexosaminidasa (D), fucosidasa (E) y manosidasa (F). El número en los picos corresponde a las estructuras propuestas descritas en la Tabla 5 y Figura 19.

Figura 28. Estructuras de oligosacáridos y su correspondiente número de pico.

Figura 29. Porcentaje relativo de glicanos tipo pausimansa, altos en manosa y complejos en los tres medios de cultivo analizados. Las barras de error provienen de la diferencia entre dos cultivos independientes.

Figura 30. Composición de glicanos complejos. . Porcentaje de sialidos (barra con diagonales), Go (barra blanca), G1 (barra líneas horizontales), G2 (barra negra) y no identificados (barra con diagonales inversas). El valor de las barra de error proviene de la diferencia entre dos cultivos independientes.

Figura 31. Porcentaje de ocupación de los sitios de glicosilación del AcM producido en medio SFM, DMEM-SFB y CDM. Los valores de las barrar de error provienen de la diferencia de los cultivos independientes.

2. INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Condiciones de cultivo a dCO_2 y pH oscilante.
- Tabla 2. Estructuras propuestas de glicanos presentes en el AcM producido bajo diferentes periodos de oscilación de OD.
- Tabla 3. Porcentaje relativo de los grupos característicos de oligosacáridos presentes en el AcM producido bajo diferentes periodos de oscilación de OD.
- Tabla 4. Principales parámetros cinéticos y estequimétricos de los cultivos a dCO_2 y pH constante y oscilante.
- Tabla 5. Identificación y cuantificación de los picos resueltos en el análisis del patrón de N-glicosilación del AcM producido en los cultivos a dCO_2 y pH constante y oscilante.
- Tabla 6. Abundancia relativa de los principales grupos de oligosacáridos presentes en el AcM producido en los cultivos a dCO_2 y pH constante y oscilante.
- Tabla 7. Principales parámetros cinéticos y estequimétricos de los cultivos realizados en los tres diferentes medios de cultivo analizados.
- Tabla 8. Identificación y cuantificación de los picos resueltos en el análisis del patrón de N-glicosilación del AcM producido en los tres diferentes medios de cultivo analizados.

3. ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo monoclonal
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
AG	Aparato de Golgi
2-AB	2-aminobenzimida
APTS	Acido 8-aminopireno 1, 2, 6-trisulfonato
Asn	Asparagina
B	Bisecto con N-Acetilglucosamina
CDM	Medio químicamente definido específico para hibridoma
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
Cel	Células
CH ₂	Dominio 2 de la región constante de la cadena pesada
CHO	Células de ovario de hámster chino
CO ₂	Dióxido de carbono
CPA	Area corregida del pico
Cte	Constante
dCO ₂	Dióxido de carbono disuelto
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC	Electroforesis capilar
ELISA	Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay
Fab	Fracción conteniendo el sitio de reconocimiento al antígeno
Fc	Fracción cristalizabile
FDA	Food and Drug Administration
F	Fucosa
G	Galactosa
Go	Estructura de glicano biantenarico sin galactosas terminales
GI	Estructura de glicano biantenarico con un residuo de galactosa terminal

G ₂	Estructura de glicano biantenarico con dos residuos de galactosa terminal
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
Glu	Glutamina
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IgG	Inmunoglobulina o anticuerpo de clase G
kDa	kilo daltons
Lac	Lactato
M	Manosa
4-MU	4-methylumbelliferone
μ	Velocidad específica de crecimiento
N ₂	Nitrógeno
O ₂	Oxígeno
OD	Oxígeno disuelto
q _{AcM}	Velocidad específica de producción de AcM
q _{Glc}	Velocidad específica de consumo de glucosa
q _{Gln}	Velocidad específica de consumo de glutamina
q _{Lac}	Velocidad específica de producción de lactato
RE	Retículo endoplásmico
S	Acido siálico
SCAD	Sistema de adquisición de datos
SDS-PAGE	Electrofoersis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes
SFB	Suero fetal bovino
SFM	Medio libre de suero específico para hibridoma
T	Temperatura
t_{ca}	Tiempos característicos
t_{mt}	Tiempo característico de transferencia de oxígeno
t_c	Tiempo característico de circulación

t_M	Tiempo característico de mezclado
t_{bt}	Tiempo característico de transferencia de calor
t_{oc}	Tiempo característico de consumo de oxígeno
t_μ	Tiempo característico de crecimiento
UG	Unidades de glucosa
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno
X	Concentración de células viables al tiempo t
X_0	Concentración de células viables inicial
$Y_{AcM/cel}$	Rendimiento de AcM por célula
$Y_{cel/Glc}$	Rendimiento de células por glucosa consumida
$Y_{cel/Gln}$	Rendimiento de células por glutamina consumida
$Y_{Lac/cel}$	Rendimiento de lactato por célula
$Y_{Lac/Glc}$	Rendimiento de lactato por glucosa consumida

4. RESUMEN

Los cultivos de células animales a gran escala e incluso de pequeña escala generalmente operan bajo condiciones de cultivo heterogéneas causadas por un mezclado ineficiente. En el presente proyecto se simuló gradientes de oxígeno disuelto (OD), pH y dióxido de carbono disuelto (dCO₂) mediante oscilaciones generadas en un sistema de escalamiento descendente conformado por un biorreactor agitado, instrumentado y computalizado. Dicho sistema en su conjunto permitió realizar cultivos bajo condiciones controladas de OD, pH y dCO₂ en valores constantes y preestablecidos además de cultivos bajo condiciones fluctuantes de OD, dCO₂ y pH con perfiles oscilatorios de periodo, amplitud y eje de oscilación predeterminados. Se determinó el efecto sobre el crecimiento y metabolismo de un hibridoma murino modelo (BCF₂) y sobre la producción y patrón de N-glicosilación del AcM secretado.

Se determinó el efecto de las condiciones heterogéneas de OD sobre el patrón de N-glicosilación del AcM producido. Cuatro condiciones oscilatorias de OD con periodos de oscilación de 800, 1600, 6400 y 12800 s, el mismo eje y amplitud de oscilación (7 % y +/- 7 % respectivamente) se compararon contra cultivos control a 10 % de OD constante. Independientemente de la condición de cultivo evaluada, el patrón de N-glicosilación resultó ser altamente heterogéneo. Un total de 31 picos fueron identificados y ca. 40 estructuras propuestas las cuales correspondieron tanto a oligosacáridos de tipo complejo (ca. 85 %) como de tipo pauci y alta manosa (ca. 15 % restante). Se determinó un incremento en el porcentaje relativo de aparición de los oligosacáridos sialidados y galactosilados triantenarios del 10 % al 30 %, a expensas de estructuras de tipo complejo sin galactosas terminales y con una galactosa terminal (G₀ más G₁ respectivamente),

las cuales disminuyeron del 50 % al 20 % de abundancia relativa, cuando el periodo de oscilación de OD se incrementó por arriba de 6400 s.

Con el objetivo de evaluar el efecto de las condiciones heterogéneas de pH y dCO₂ se realizaron cultivos por duplicado a dCO₂ y pH oscilante manteniendo el OD constante en 50 %. Tres periodos de oscilación fueron evaluados, 1800, 3600 y 7200 s, cada condición con diferentes ejes y amplitudes de oscilación. Como control se realizaron cultivos por duplicado a 12, 50, 170 y 250 mbar de dCO₂ constante manteniendo el pH constante en 7.2 y el OD en 50 % en todos los cultivos. Los cultivos control a dCO₂ y pH constante a dCO₂ fisiológico de 50 mbar favorecieron el crecimiento celular alcanzando las más altas concentraciones celulares y un mejor aprovechamiento de las fuentes de carbono y energía. Sin embargo, fue en los cultivos bajo condiciones de hipocapnia a 12 mbar e hipercapnia a 170 mbar donde se favoreció la producción de AcM. Con respecto a los cultivos realizados bajo las tres condiciones oscilatorias de dCO₂ y pH se determinó un efecto negativo sobre el crecimiento, metabolismo celular y producción de AcM a medida que se incrementó el periodo de oscilación. Sin embargo, las concentraciones de AcM alcanzadas bajo condiciones oscilatorias fueron mayores que las obtenidas bajo condiciones constantes. Se determinó mediante electroforesis capilar de carbohidratos el efecto de las diferentes condiciones de cultivo a dCO₂ y pH tanto constante como oscilante sobre el patrón de N-glicosilación del AcM producido. Al igual que en los análisis mediante el método cromatográfico, el patrón de N-glicosilación determinado fue altamente heterogéneo independientemente de la condición de cultivo evaluada. Un total de 31 picos fueron resueltos los cuales correspondieron tanto a oligosacáridos de tipo complejo (ca. 85 %) como de tipo pauci y alta manosa (ca. 15 % restante). Los cultivos a 50 mbar de dCO₂ y pH constante y a 1800 s de periodo de oscilación

de dCO₂ y pH oscilante presentaron una menor heterogeneidad, con 25 de los 31 picos identificados. En los cultivos a 50 mbar de dCO₂ y pH constante se determinó un incremento en el porcentaje relativo de estructuras complejas con ácido siálico terminal (6-7 % para las demás condiciones y 15 % para la condición en cuestión) a expensas de estructuras complejas sin galactosas terminales de tipo Go que pasaron de un 35-40 % para las demás condiciones evaluadas a un 29 % para la condición en cuestión.

Se determinó también, el efecto del tipo de medio de cultivo, sobre el crecimiento y metabolismo del hibridoma y sobre el patrón de N-glicosilación del AcM producido. Se evaluó un medio de cultivo tradicional DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (DMEM-SFB) y dos medios de cultivo comerciales para hibridomas, uno libre de suero fetal bovino (SFM) y otro químicamente definido (CDM). Los cultivos realizados con los medios SFM y CDM alcanzaron mayores concentraciones celulares y de AcM que los realizados con el medio DMEM-SFB. Los análisis del patrón de N-glicosilación del AcM producido mostraron diferencias importantes. En los cultivos en medio DMEM-SFB un total de 26 estructuras de oligosacárido fueron identificadas mientras que los cultivos en medio CDM y SFM mostraron una microheterogeneidad menor con 24 y 22 estructuras de las 26 identificadas respectivamente. En los cultivos en medio DMEM-SFB y CDM el porcentaje relativo de estructuras de tipo Go representó el 28 % y 32 % respectivamente en tanto que el porcentaje de estructuras galactosiladas (G₁ más G₂) representó el 42 % y 46 % respectivamente. En contraste, el porcentaje de estructuras de tipo Go en los cultivos con medio SFM se incrementó al 58 % y solamente el 28 % correspondió a las estructuras de tipo G₁ y G₂. La determinación de actividades enzimáticas de exoglicosidasas extracelulares mostró un incremento del 300 % en la actividad β-galactosidasa en los cultivos con medio SFM, lo que mostró un posible

mecanismo para tal incremento de estructuras de tipo G_0 a expensas de estructuras G_1 y G_2 .

5. INTRODUCCIÓN

A más de tres décadas de la creación de los primeros Anticuerpos Monoclonales mediante la revolucionaria tecnología de hibridomas, no es sino hasta nuestros días que los AcM realmente han probado su eficacia clínica y seguridad como moléculas para uso terapéutico en el tratamiento exitoso de diversos e importantes padecimientos como el cáncer, el asma, la artritis reumatoide, etc. Dada la complejidad estructural que caracteriza a estas proteínas, su producción eficiente hasta el momento únicamente puede ser llevada a cabo mediante la tecnología de cultivo de células animales. Estos sistemas de expresión de proteínas recombinantes sin embargo, tienen la desventaja de no alcanzar altas concentraciones celulares ni de producto cuando se utilizan métodos de cultivo convencional. Para poder contender con dicha problemática y así satisfacer los altos requerimientos de AcM que se han estimado para los próximos años, los volúmenes de operación de los cultivos se han incrementado sustancialmente pasando de los biorreactores de escala laboratorio a reactores con volúmenes que alcanzan los 20 m³. Además, el diseño racional de medios de cultivo y el uso de novedosas metodologías de cultivo han sido implementadas con la finalidad de incrementar de manera sustancial las concentraciones celulares, los tiempos de cultivo y ulteriormente la concentración final del AcM.

La experiencia acumulada en el área de bioprocesos con células animales para la producción de AcM en los últimos 10 años muestra que tanto el escalamiento del bioproceso como la etapa de cultivo celular a gran escala representan el principal cuello de botella y motivo de preocupación para poder establecer procesos de producción de AcM que sean altamente productivos (en el orden de gr L⁻¹) y al mismo tiempo consistentes en el patrón de glicosilación del AcM como una

medida de la calidad del producto para poder cumplir con los cada vez más exigentes requerimientos regulatorios. Buena parte de la preocupación se centra en el hecho de que existen múltiples factores como por ejemplo la metodología empleada para escalar el proceso, la fragilidad inherente a las mismas células, el control y modo de operación del bioproceso que de manera independiente o combinada ocasionan la presencia de heterogeneidades de los principales parámetros de cultivo como el oxígeno disuelto, el pH, y el dióxido de carbono disuelto durante la operación de los cultivos a gran escala. Dichos gradientes, en la mayoría de los casos inevitables, pueden tener un impacto negativo importante en los rendimientos y productividades del AcM de interés así como en su patrón de glicosilación. Sin lugar a dudas el estudio de las condiciones de heterogeneidad presentes en los sistemas de cultivo de células animales tanto de pequeña como de gran escala juega un papel determinante para poder establecer dichos bioprocesos altamente productivos. Desafortunadamente, debido entre otros factores a las imposibilidades técnicas y económicas para realizar experimentación a escala industrial, muy poca investigación y conocimiento se han generado en el área.

La glicosilación de AcM por su parte es una modificación postraducciona que viene dada por la acción secuencial de múltiples enzimas compartimentadas en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, por lo tanto es susceptible a las condiciones ambientales de cultivo prevalentes como el OD, pH, dCO_2 y el tipo de medio de cultivo utilizado entre otros. Las diferentes estructuras de oligosacárido sintetizadas en los AcM les confieren actividades biológicas diferentes que tienen un impacto importante en su capacidad como moléculas terapéuticas. Por tal motivo, en el presente proyecto se determinó, mediante un esquema de escalamiento descendente (simulación de una problemática de escala industrial en un reactor de escala laboratorio), el impacto que los gradientes de OD,

pH y dCO_2 tienen sobre la microheterogeneidad del patrón de N-glicosilación de un AcM modelo producido por cultivos de hibridomas murinos. Se determinó también el efecto de dichos gradientes sobre los principales parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo de hibridomas y de la producción del AcM. Las variables de cultivo evaluadas son las más críticas en cuanto a problemas potenciales de heterogeneidad en reactores utilizados para el cultivo de células animales a gran escala, de manera tal que, el estudio de los efectos de dichos gradientes nos permitió dar luz a cuestionamientos tales como si la presencia de gradientes ambientales en reactores de células animales a gran escala ¿realmente representan un problema que debe ser evitado? ¿pueden ser tolerados hasta cierto nivel? o incluso ¿deberían ser provocados con la finalidad de obtener un beneficio?

En comparación con los medios tradicionales suplementados con suero fetal bovino, el diseño de nuevos medios de cultivo libres de este componente indefinido han mostrado favorecer el crecimiento y la producción de las proteínas de interés, además de que facilitan su purificación. Sin embargo, por ser el medio de cultivo el principal elemento nutricional, realizar modificaciones en su composición tendientes a mejorar el crecimiento celular o la producción de AcM pueden ocasionar alteraciones importantes en el patrón de glicosilación del AcM de interés ya sea por los componentes mismos del medio de cultivo o por alteraciones ocasionadas en el metabolismo celular. Dada la importancia de la glicosilación en la actividad biológica de los AcM cuando son empleados como moléculas terapéuticas y de la inminente necesidad por establecer procesos consistentes de producción de AcM, en el presente estudio se realizó además un análisis cuantitativo por electroforesis capilar de carbohidratos del efecto sobre el patrón de glicosilación del AcM producido por el hibridoma BCF2 cuando fue cultivado en un medio de cultivo tradicional DMEM suplementado con 10 % de suero fetal

bovino (SFB) denominado (DMEM-SFB) y en dos medios comerciales libres de SFB denominados SFM y CDM. Se determinó además el efecto en el desempeño de los cultivos.

6. ANTECEDENTES

6.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE AcM TERAPÉUTICOS

A poco más de un siglo de que Paul Ehrlich acuñase el término “balas mágicas” para referirse a anticuerpos unidos a toxinas (moléculas en aquel tiempo hipotéticas) con capacidad para unirse de manera específica a un parásito invasor (antígeno) y aniquilarlo sin ocasionarle daño al organismo (Ehrlich, 1900; Witkop, 1999) y a más de tres décadas de la creación de los primeros Anticuerpos Monoclonales mediante la revolucionaria tecnología de hibridomas (Kohler y Milstein, 1975; Alkan, 2004), no es sino hasta nuestros días que los AcM realmente han probado su eficacia clínica y seguridad como moléculas para uso terapéutico en el tratamiento de padecimientos como el cáncer y otras patologías de tipo inmunológico e inflamatorio (Glennie y Johnson, 2000). En el periodo comprendido entre 1997 y 2006 un total de 19 AcM fueron aprobados por la FDA para su uso como agentes terapéuticos en diferentes padecimientos y aproximadamente 400 más están siendo evaluados en pruebas clínicas en este momento (Riley, 2006). Tan sólo en 2006 las ventas de AcM a nivel mundial superaron los 20,000 millones de dólares (Maggon, 2007) por lo que se considera que estas balas mágicas se encuentran en su etapa de oro colocándose como los productos farmacéuticos de origen biotecnológico más exitosos y de mayor demanda para los años siguientes (Reichert y Pavlou, 2004). En comparación con otras proteínas terapéuticas recombinantes, las dosis necesarias de AcM son muy altas, en el orden de cientos de miligramos e incluso gramos de AcM por dosis y en la mayoría de los casos se requiere de múltiples dosis (Ej. Rituxan[®]/MabThera[®], Remicade[®], Herceptin[®], etc.)

(Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2007), situación que enfatiza la necesidad de producir grandes cantidades de AcM. La demanda que se ha pronosticado en el mercado de AcM terapéuticos para los próximos años asciende a los cientos de kilogramos e incluso una tonelada de AcM por año (Ozturk, 2006), situación impensable tan sólo unos años atrás. Debido a la complejidad estructural de estas glicoproteínas (aprox. 150 kDa de masa molecular, 16 puentes disulfuro y dos sitios de N-glicosilación indispensables para su actividad biológica) (Goldsby *et al.*, 2003) su producción hasta la fecha únicamente puede ser llevada a cabo mediante la tecnología de cultivo de células animales. Estos sistemas de expresión de proteínas recombinantes en comparación con los sistemas bacterianos o de levaduras, si bien tienen la capacidad de hacer modificaciones post-traduccionales como la glicosilación compleja de proteínas, presentan entre otras, las desventajas de no alcanzar altas concentraciones celulares ni de producto, en el orden de cientos de miligramos de AcM por litro de medio de cultivo cuando se cultivan de manera convencional en cultivos por lote de células en suspensión (Merten, 2006).

Para poder satisfacer las demandas de AcM que se han previsto, un sin número de plantas biotecnológicas de producción se han venido construyendo y validando alrededor del mundo. El común denominador de todas ellas es que los volúmenes de cultivo se han incrementado sustancialmente pasando de biorreactores agitados de escala laboratorio a reactores con volúmenes que alcanzan los 20 m³ (Nienow, 2006). Además, el diseño racional de medios de cultivo químicamente definidos libres de suero aunado al uso de metodologías novedosas de cultivo se han intensificado con la finalidad de incrementar la concentración celular, los tiempos de cultivo y finalmente la concentración de AcM (Farid, 2006).

6.2 IMPORTANCIA DEL OD, PH Y DCO₂ EN LA GLICOSILACIÓN DE LOS AcM Y EN EL DESEMPEÑO DE LOS CULTIVOS DE HIBRIDOMAS

El OD es sin duda alguna uno de los sustratos más importantes en los cultivos de hibridomas. Debido a la baja solubilidad que tiene en el medio debe ser continuamente suplementado al cultivo. Concentraciones de OD por debajo del nivel crítico (2-10 %) e incluso por arriba de 50 % pueden ocasionar alteraciones en el metabolismo de las principales fuentes de carbono y energía (glucosa y glutamina) así como de los principales productos metabólicos (lactato y amonio) de los hibridomas (Miller y Blanch, 1991; Ozturk y Palsson, 1990, 1991). El oxígeno es un elemento esencial para la producción eficiente de energía (ATP) ya que participa como aceptor final de electrones y protones producidos en las reacciones de oxidación de la cadena respiratoria (Lodish *et al.*, 2000). El OD es también el mayor determinante del potencial redox del cultivo, el cual puede tener implicaciones en el crecimiento, metabolismo y producción del AcM por los hibridomas (Hwang y Sinskey, 1991). Kunkel *et al.* (1998) reportan que la concentración de oxígeno disuelto es uno de los múltiples factores que pueden afectar la glicosilación de los anticuerpos. Ellos realizaron cultivos en continuo y determinaron los patrones de glicosilación de un AcM a tres diferentes porcentajes de OD (100, 50 y 10 %). Observaron que a medida que el porcentaje de OD disminuía, el nivel de galactosilación del AcM también fue disminuyendo, encontrándose cada vez porcentajes mayores de estructuras tipo G₀ y G₁ y menores de tipo G₂.

El potencial de hidrógeno tiene una marcada influencia en los cultivos de hibridomas y de las células animales en general. Este regula la actividad de la mayoría de las enzimas del metabolismo celular y por ende puede afectar también las enzimas del proceso de glicosilación. Cada línea celular presenta un pH óptimo, generalmente entre 7.0 y

7.5 y sólo toleran pequeñas variaciones por lo que cambios incluso de 0.1 unidades de pH pueden ocasionar daños irreversibles a las células (Ozturk y Palsson 1991; Wayte *et al.*, 1997). En general se ha observado que a valores de pH bajos se presentan bajas velocidades de consumo de glucosa y/o bajo rendimiento de lactato producido por glucosa.

El CO₂ por su parte es un producto del metabolismo oxidativo de las células animales, por lo tanto, por cada mol de oxígeno que es consumido aproximadamente un mol de CO₂ es secretado al medio. El CO₂ es una molécula no polar que es capaz de difundirse a través de la membrana plasmática, donde puede hidratarse y disociarse en sus iones H⁺ y HCO₃⁻, lo que puede ocasionar una disminución del pH intracelular aún cuando el pH extracelular fuese constante y óptimo. Además, si el pH es controlado mediante la adición de bicarbonato de sodio, se promueve la acumulación de altas concentraciones de dCO₂ con lo que pueden presentarse problemas tanto de gradientes de pH y dCO₂ como de incremento en la osmolaridad del medio de cultivo. Por lo tanto el CO₂ debe de ser continuamente removido del medio de cultivo, situación que resulta problemática en los cultivos de células animales a gran escala y/o alta concentración celular debido a la imposibilidad de airear y agitar vigorosamente, como se explica en la siguiente sección. Existen reportes en la literatura donde se muestra el efecto negativo en el crecimiento y producción de la proteína de interés cuando los cultivos de células animales son expuestos a altas concentraciones de dCO₂ con o sin control de pH (Kimura y Miller, 1996; Gray *et al.*, 1996; Zanghi *et al.*, 1999; deZengotita *et al.*, 1998). Schmelzer y Miller (2002) evaluaron el efecto del dCO₂ y la osmolaridad del medio en cultivos de hibridomas productores de una IgG2a. Observaron que a dCO₂ de 250 mmHg y osmolalidad de 476 mOsm kg⁻¹ el patrón de glicosilación del AcM se vió afectado. Observaron una disminución en los niveles de estructuras

galactosiladas y de alta manosa. Sin embargo, no observaron cambios en la macroheterogeneidad de la glicosilación.

6.3 CAUSAS DE LA FORMACIÓN DE GRADIENTES DE OD, PH Y DCO₂ EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES

Existen diversas razones que de manera independiente o combinada pueden ocasionar la formación de gradientes de concentración de las principales variables de cultivo como son el OD, el pH y el dCO₂ al aumentar la escala de operación de un proceso. Tales razones tienen que ver con las características particulares inherentes a las células animales, las metodologías de escalamiento empleadas y el uso cada vez más generalizado de sistemas de cultivo que generen altas concentraciones celulares.

A diferencia de las bacterias las células animales carecen de pared celular por lo que están expuestas a esfuerzos potencialmente letales tales como el rompimiento de las burbujas en la superficie del líquido durante la aireación burbujeada y/o los esfuerzos de corte generados por el impulsor durante la agitación (Ramírez y Mutharasan, 1990b; Oh *et al.*, 1992; Al-Rubeai *et al.*, 1995; Chisti, 2000). En consecuencia, estas células no soportan altas velocidades de agitación y/o aireación (Michaels *et al.*, 1996; Jöbses *et al.*, 1991), lo que limita fuertemente las condiciones de operación incluso de los reactores de laboratorio. Esto a su vez resulta que en los reactores de gran escala inevitablemente ocurra un mezclado deficiente. Las consecuencias de un pobre mezclado generan un medio ambiente heterogéneo con baja transferencia de masa. El resultado final es un sistema con gradientes de concentración de las principales variables de cultivo como el OD, dCO₂ y pH, limitación de nutrientes y acumulación de productos indeseados (Nienow, 2006).

Con respecto al proceso de escalamiento lo que en principio se desea es que el biorreactor de escala mayor tenga el mismo desempeño que el reactor de laboratorio incluyendo una buena homogeneidad y transferencia de masa. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones tales requerimientos no son posibles de satisfacer debido a la dificultad práctica para alcanzar las mismas condiciones que más fácilmente se consiguen en los reactores de laboratorio y además, a la carencia de correlaciones y estrategias adecuadas de escalamiento (Charles, 1985; Oosterhuis, 1984; Schügerl, 1993). En esencia menciona Oldshue (1966) que siempre que existan fenómenos de transporte en un sistema de cultivo habrá dificultades durante su escalamiento. El gran problema relacionado con el escalamiento de los cultivos de células animales a volúmenes mayores radica fundamentalmente en que se basa en procedimientos de escalamiento utilizados y concebidos para sistemas bacterianos. Lo anterior se entiende principalmente por la falta de madurez y experiencia en el área que no ha permitido desarrollar procedimientos de escalamiento específicos para células animales. De acuerdo con Nienow (2006), quizá los primeros reportes donde se hace una descripción de un reactor agitado de alto volumen para el cultivo de células animales fueron en 1965 y 1985 para reactores de 30 L y 8 m³ respectivamente. Esto muestra la juventud de este campo. Dada la gran diferencia que existe entre los cultivos bacterianos y de células animales (diferentes requerimientos de energía, agitación, aireación, etc.) resulta obvio que los criterios de escalamiento empleados suelen ser inadecuados, dando como resultado reactores de gran escala con problemas de homogeneidad y transferencia de masa que se traducen en la presencia de gradientes de las variables de cultivo, limitación de nutrientes y/o acumulación de productos no deseados (Varley y Birch, 1999).

Finalmente, las concentraciones celulares máximas que comúnmente se alcanzan mediante los procedimientos convencionales de cultivo

por lote y en continuo son del orden de 10^6 cel mL⁻¹, en consecuencia se tienen bajas concentraciones y productividades de AcM. En dichas condiciones de cultivo la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) y la acumulación de metabolitos indeseables como el lactato y el dCO₂ no representan un problema siempre y cuando se establezca una buena estrategias de control del cultivo. Sin embargo, dada la tendencia generalizada por implementar estrategias novedosas de cultivo, como el cultivo continuo con retención de células (perfusión) y el lote alimentado, con las que es posible alcanzar concentraciones celulares del orden de 10^7 cel mL⁻¹ y con ésto aumentar las concentraciones y productividades de AcM, la VCO y la acumulación de metabolitos de desecho como el dCO₂, el lactato y el amonio se convierten en un problema (Xiao *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2000). Lo anterior en conjunto con un deficiente mezclado puede ocasionar, como ya se ha mencionado en los puntos anteriores, limitaciones de nutrientes como el OD, acumulación de altas concentraciones de productos no deseados como el dCO₂ y el lactato y la formación de gradientes espaciales de concentración de OD, dCO₂ y pH.

6.4 EL ESCALAMIENTO DESCENDENTE Y LA EVIDENCIA DE GRADIENTES EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES

La metodología clásica del escalamiento descendente consiste en detectar el o los mecanismos limitantes de un proceso de cultivo y poderlos reproducir de manera independiente en simuladores de pequeña escala, manteniendo constantes todas las demás variables de cultivo y sin la necesidad de mantener similitud geométrica (Oosterhuis, 1984). En este procedimiento se distinguen cuatro etapas: (1) análisis de régimen del proceso en escala de producción; (2) simulación en escala laboratorio del mecanismo limitante del proceso;

- (3) optimización y modelamiento del proceso en escala laboratorio; y
- (4) optimización del proceso a escala de producción mediante la traslación de las condiciones optimizadas a escala laboratorio.

El análisis de régimen nos permite determinar cuál es el paso limitante de nuestro proceso. Se realiza mediante la comparación de los tiempos característicos (t_{ca}) de los principales subprocesos del sistema. Los t_{ca} son una medida de la velocidad de los procesos dentro del biorreactor. Un valor pequeño en un t_{ca} nos indica un mecanismo que se lleva a cabo muy rápidamente, mientras que un valor alto, refleja un mecanismo lento. Los t_{ca} pueden ser determinados teóricamente, a partir de correlaciones existentes en la literatura o bien ser determinados experimentalmente.

Por comparación de los t_{ca} de los fenómenos de transporte del biorreactor (tiempo característico de transferencia de oxígeno (t_{mt}), de circulación (t_c), de mezclado (t_M), de transferencia de calor (t_{ht}) etc.) con los t_{ca} de los procesos realizados por el ente biológico (tiempo característico de consumo de oxígeno (t_{oc}), de crecimiento (t_μ) etc.) se puede establecer si el desempeño del biorreactor estará controlado por los fenómenos de transporte del biorreactor o por los fenómenos biológicos. En el caso de que el proceso esté controlado por los fenómenos de transporte, la presencia de gradientes o limitaciones de las variables de cultivo es muy probable que ocurra.

Existen evidencias de que el pobre mezclado, incluso en tanques agitados de baja escala, es causante de problemas significativos de gradientes de pH y acumulación de dCO_2 en cultivos de hibridomas, células CHO (células de ovario de hámster chino) y células de insecto, cuando se cultivan a altas densidades celulares. Por ejemplo, **Ozturk (1996)** observó problemas de muerte celular en cultivos de células CHO debido a altas concentraciones de base en el punto de adición durante el control del pH. Por su parte **Garnier et al. (1996)** observaron en cultivos de células de insecto que la acumulación de dCO_2 era

inhibitoria para la producción del receptor TGF β recombinante. Igualmente, **Gray et al. (1996)** observaron en cultivos de células CHO una reducción dramática en la productividad debido a la alta acumulación de dCO₂ como resultado de la implementación de estrategias tendientes a minimizar el daño celular (aireación con microburbujas). Lo más relevante de los trabajos anteriormente citados es que los problemas de gradientes ambientales se detectaron en cultivos de volúmenes relativamente pequeños, es decir entre 15 y 500 L.

La presencia de gradientes de las variables de cultivo para reactores bacterianos a gran escala, está ampliamente fundamentado (**Manfredini et al., 1983; Oosterhuis y Kossen, 1984**). Sin embargo, hasta la fecha no hay reportes en la literatura de estudios hechos en reactores de células animales a gran escala donde se hayan realizado mediciones de OD, dCO₂ y pH en diferentes puntos del biorreactor para determinar si existe la formación de gradientes. Lo que sí se ha realizado aunque escasamente, son determinaciones teóricas y experimentales de t_{ca} y con base en un análisis de régimen se estima la posibilidad de formación de gradientes o de limitación de OD y pH (**Kiss et al., 1994**). **Doran (1993)** calculó y comparó los tiempos característicos para el cultivo de células vegetales en un reactor tipo *air-lift* y en un tanque agitado, ambos reactores con un volumen de 10 m³. Dentro de sus resultados reporta que a concentraciones celulares de 5 kg m⁻³ (al inicio del cultivo) el t_M y el t_{mt} son menores al t_{oc} , por lo cual no existirá limitación de oxígeno. Sin embargo el t_M y el t_{mt} , son de mismo orden de magnitud, lo cual indica que la formación de gradientes sí puede ocurrir. La situación se torna más crítica en las etapas finales del cultivo cuando se alcanzan concentraciones celulares de 30 kg m⁻³, en donde para el reactor tipo *air-lift* los tres tiempos característicos (t_M , t_{mt} , y t_{oc}) son del mismo orden de magnitud, lo que refleja que el mezclado se volvió ineficiente y la formación de

gradientes así como la limitación de oxígeno pueden ocurrir. En el caso del reactor agitado, t_M se mantiene en un valor bajo, por lo cual el mezclado sigue siendo eficiente, sin embargo a bajas velocidades de agitación t_m es mayor que t_{oc} , por lo que se pudieran presentar limitaciones de oxígeno.

El reporte de **Tramper et al. (1996)** es el primero en donde se han hecho estimaciones para predecir la formación de gradientes de OD en el cultivo de células animales (células de insecto) a pequeña y gran escala, en tres tipos de reactores hipotéticos (un tanque agitado, una columna burbujeada y un “*air-lift*” de brazo externo) con volúmenes de 0.01 m³ y 10 m³. Se asume un consumo de oxígeno típico de células animales de 10⁻¹⁶ mol O₂ cel⁻¹ s⁻¹ y tres concentraciones celulares máximas; 10⁶ cel mL⁻¹ (típico de un cultivo lote o continuo), 10⁷ cel mL⁻¹ (típico para un cultivo en perfusión) y 10⁸ cel mL⁻¹ (concentraciones celulares hipotéticas que pudieran alcanzarse en el futuro). Calcularon los t_c para los tres tipos de reactores y los compararon con los t_{oc} a las tres concentraciones celulares. Encontraron que los t_c y t_{oc} fueron del mismo orden de magnitud a concentraciones celulares de 10⁷ cel mL⁻¹ y más aún a 10⁸ cel mL⁻¹ por lo cual la presencia de gradientes e incluso el agotamiento de oxígeno podía ocurrir. Concluyeron que dadas sus estimaciones la presencia de gradientes es muy probable que ocurra en diferentes situaciones. Este estudio es un reflejo de la creciente preocupación por la presencia de gradientes de oxígeno disuelto en cultivos de células animales a gran escala y a altas densidades celulares.

Nienow et al. (1996) y **Langheinrich et al. (1998)** realizaron estudios extensivos en la caracterización de un reactor de 8 m³ para el cultivo de células de mamífero a gran escala y simulan en reactores de escala laboratorio los tiempos característicos del reactor a gran escala. En ambos reportes concluyen que dadas las magnitudes de los tiempos característicos encontrados es muy probable la formación de

gradientes de pH y OD en el reactor a gran escala. Langheinrich y Nienow (1999), reportaron la simulación de tales gradientes de pH en reactores de laboratorio.

6.5 EL PROCESO DE GLICOSILACIÓN, LA GLICOSILACIÓN EN ACM Y SUS IMPLICACIONES EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La mayoría de las proteínas secretadas por las células de mamífero son glicoproteínas. Estas proteínas poseen oligosacáridos covalentemente unidos a través de una asparagina (N-glicosilación) o a través de una serina o treonina (O-glicosilación) de la cadena polipeptídica. Una proteína dada puede tener un sólo tipo de glicosilación o ambos y en múltiples sitios dependiendo de su secuencia de aminoácidos (Kornfeld y Kornfeld, 1985). En la N-glicosilación compleja, que es el tipo presente en los AcM, se comienza con la síntesis de dolicol fosfato, un oligosacárido unido a un lípido mediante un enlace difosfato (Glc₃Man₉GlcNac₂-P-P-dol) el cual es transferido en bloque a la cadena polipeptídica naciente en el retículo endoplásmico (RE). Ahí mismo se continua con una serie de reacciones de corte que son catalizadas por medio de exoglicosidasas, con lo que se obtiene un oligosacárido de “alta manosa” para cuando la proteína sale del RE. El procesamiento del oligosacárido continua en los compartimentos del aparato de Golgi (AG), a través de una serie de reacciones catalizadas por exoglicosidasas y glicosiltransferasas específicas, para generar finalmente AcM con oligosacáridos de “tipo complejo”.

Dada la localización de los carbohidratos en la superficie de las proteínas, no es de sorprender que su estructura tenga un efecto significativo en las propiedades fisicoquímicas de éstas, incluyendo estabilidad térmica y solubilidad. La estructura del oligosacárido también ha mostrado tener un efecto importante en las propiedades biológicas de las glicoproteínas, por ejemplo en su tiempo de residencia, inmunogenicidad y respuesta efectora en el caso de los AcM (Arnold *et al.*, 2007).

La síntesis proteica es un proceso que se encuentra regido por la secuencia de bases nitrogenadas de un ARN mensajero, lo que asegura una alta fidelidad en la estructura de las proteínas. En contraste, el proceso de glicosilación es el resultado de la acción secuencial de múltiples enzimas compartimentadas en el RE y el AG, lo que puede ocasionar una variabilidad en la estructura de los oligosacáridos de acuerdo a las condiciones medioambientales de cultivo prevalecientes (Andersen y Goochee, 1994; Goochee y Monica, 1990). *In vivo*, esta variabilidad tiene la función de regular de una manera muy exquisita el tiempo de eliminación o la actividad biológica de algunas proteínas. Sin embargo durante la producción de proteínas por cultivo de células *in vitro*, la variabilidad ocasionada por las condiciones medioambientales no puede ser ignorada, dada la importancia que tiene la estructura de los oligosacáridos sobre las propiedades terapéuticas de la proteína de interés.

Los anticuerpos de clase G (IgG), ya sean producidos por células B en el organismo o a través del cultivo de células de mamífero, contienen alrededor de un 2-3 % de carbohidratos en peso. Presentan un sitio muy conservado de N-glicosilación en la asparagina 297 (Asn-297) de la fracción cristalizable (Fc) del anticuerpo, específicamente en el dominio dos de la región constante de la cadena pesada (CH₂), como se muestra en la Figura 1. Estos oligosacáridos unidos en cada cadena se encuentran situados hacia el espacio interno del anticuerpo entre los dos dominios CH₂. Los dominios CH₂ a su vez están unidos por dos (en humanos) o tres (en ratón) puentes disulfuro entre las cadenas pesadas en la denominada región de la bisagra (Clark, 1997). La estructura de la N-glicosilación en los anticuerpos es de “tipo complejo” y en su mayoría con estructuras de dos ramificaciones (biantenaria). A diferencia de la glicosilación comúnmente encontrada en otras glicoproteínas (conteniendo oligosacáridos complejos biantenarios, con ácidos siálicos terminales en los extremos de las

antenas), en los anticuerpos únicamente se llega hasta galactosas como monosacáridos terminales. Se cree que la ausencia de ácidos siálicos en estos oligosacáridos, se debe a la inaccesibilidad de la región interna de los dominios CH₂, por lo cual, las enzimas sialiltransferasas no logran incorporar ácidos siálicos. Agrupando a los oligosacáridos presentes en las IgG de acuerdo al número de galactosas terminales, podemos identificar tres tipos de estructuras mayoritarias, a las que comúnmente se les denomina G₀, G₁ y G₂, por tener cero, una o dos galactosas terminales respectivamente (Wright y Morrison, 1997; Ma y Nashabeh, 1999).

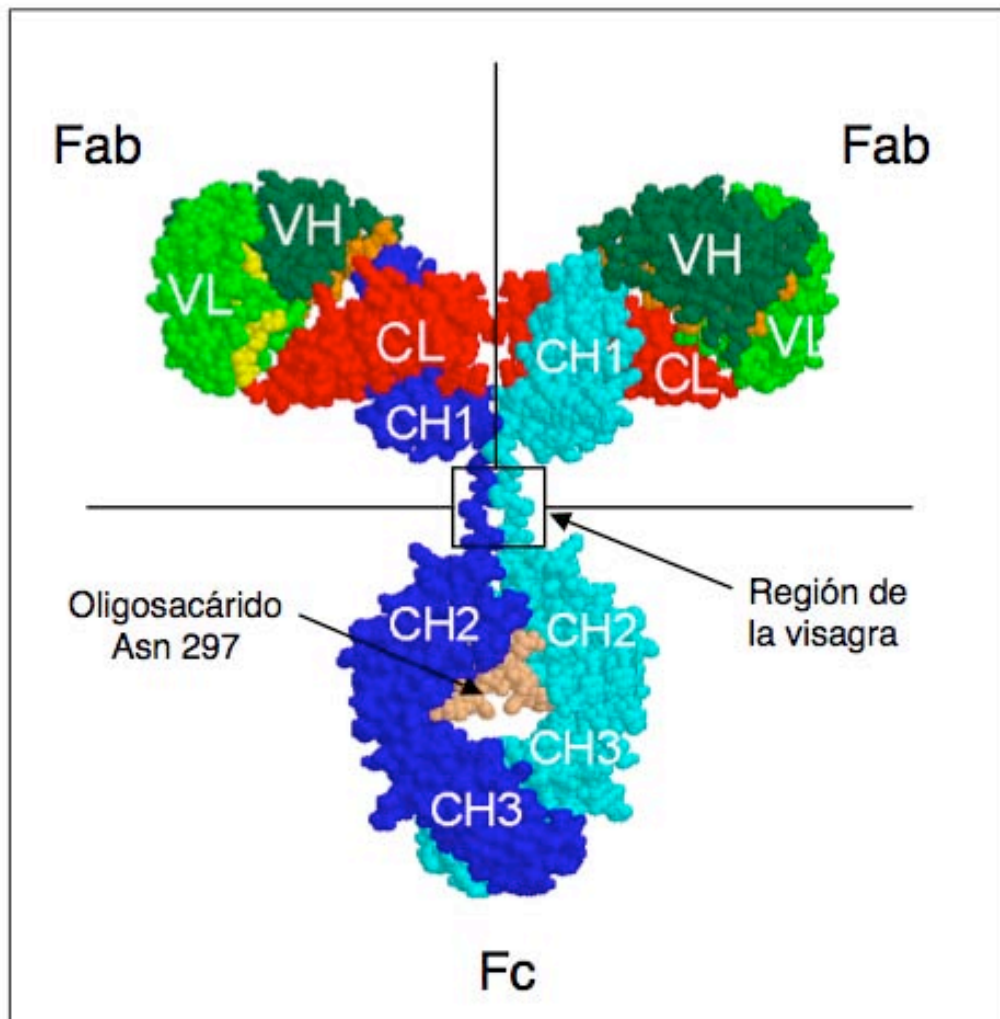


Figura 1. Estructura cuaternaria de la molécula de IgG mostrando sus diferentes dominios y su oligosacárido.

La glicosilación de la Asn-297 del dominio CH₂ del Fc de los AcM no está implicada en el reconocimiento e interacción del anticuerpo con su antígeno. Sin embargo juega un papel muy importante en el tipo de respuesta efectora que estas macromoléculas desencadenan, de ahí la importancia en controlar las estructuras de los oligosacáridos cuando se producen anticuerpos monoclonales terapéuticos cuya farmacodinámica implica ya sea orquestar una respuesta citotóxica o la activación del sistema de complemento. Aunque se ha determinado que ciertas estructuras de oligosacáridos tienen una alta afinidad en la unión hacia determinados receptores celulares y por ende a desencadenar determinado tipo de respuesta efectora, la realidad es que hasta el momento no se tiene un panorama completo tanto del tipo de receptores, como de la afinidad con la que cada una de las estructuras de oligosacárido que han sido identificadas para anticuerpos se una a su receptor. En términos de la respuesta efectora del AcM se ha identificado que la glicosilación influye los procesos de activación de la cascada del complemento a través de la proteína C1q, así como en el proceso de unión y activación de los receptores de las clases FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) presentes en los leucocitos (Clark, 1997). Ambos procesos asisten la opsonización de antígenos, desencadenan la respuesta inflamatoria y potencian la respuesta inmune en contra de agentes infecciosos (Goldsby *et al.*, 2003). Algunas de las funciones del AcM que no depende de la glicosilación son su tiempo de vida media y la unión a las proteínas bacterianas G y A. La producción de AcM sin oligosacáridos (por medio de tratamiento con inhibidores metabólicos, endoglicosidasas o producidos en sistemas bacterianos) han mostrado una marcada reducción de su actividad biológica. Por ejemplo Nose y Wigzell (1983) trataron IgG de ratón con tunicamicina (un inhibidor metabólico que no permite la unión del oligosacárido en la Asn-297) y

observaron que los anticuerpos perdieron completamente su capacidad para activar tanto complemento como receptores Fcγ, además de que no desencadenaron respuesta citotóxica (ADCC).

6.6 IMPLICACIONES DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA GLICOSILACIÓN DE LOS AcM

El crecimiento óptimo de las células animales es generalmente llevado a cabo en medios de cultivo base, químicamente definidos pero que además contienen relativamente altos niveles de suero fetal bovino (SFB) (5-10 %) sin el cual las células no podrían crecer. Sin embargo, para establecer procesos de producción de AcM es fundamental que el SFB y otras proteínas de origen animal sean omitidas de la formulación para poder producir AcM altamente puros, de calidad consistente y sin riesgo de contaminación con agentes indeseados como los virus. Un medio de cultivo químicamente definido en su totalidad (CDM) ofrece la ventaja de ser consistente lote a lote y de no depender de componentes de origen animal o vegetal cuyo suplemento puede ser incierto. Además, el CDM facilita el proceso de purificación y la aprobación del producto por las entidades regulatorias (<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm#97>; Froud, 1999; Merten, 1999; Jayme y Smith, 2000; Even *et al.*, 2006). En los últimos años, diferentes líneas celulares de hibridomas y mielomas han sido exitosamente adaptadas a crecer en medios libres de suero (SFM) y CDM con la concomitante selección para mejorar la densidad celular y el rendimiento de AcM (Csirke *et al.*, 1999; Gorfien *et al.*, 1999 y 2000; Voygt y Zintl, 1999; Valdes *et al.*, 2001). La calidad y la consistencia de los AcM implica una glicosilación correcta y reproducible. Sin embargo, existe relativamente escasa información sobre el impacto de los medios SFM o CDM en el patrón de

glicosilación de los AcM producidos por cultivo de células animales (Lund *et al.*, 1993; Marino *et al.*, 1997; Hills *et al.*, 1999).

Existen múltiples factores ambientales que pueden alterar la glicosilación de los AcM, entre éstos el medio y el método de cultivo (Jefferis y Lund, 1997; Goochee y Monica, 1990; Goochee *et al.*, 1991; Andersen y Goochee, 1994). Un ejemplo de una diferencia cualitativa es el trabajo de Patel *et al.* (1992), donde observaron que los glicanos con ácido siálico terminal no fueron detectados cuando un AcM IgG1 fue producido en ascitis, mientras que un contenido intermedio y alto de ácido siálico fue observado cuando fue producido por cultivo de los hibridomas utilizando medio suplementado con SFB y SFM. Adicionalmente, los AcM producidos en cultivo con SFB tuvieron un contenido molar más bajo de oligosacáridos galactosilados terminales comparado con las otras dos condiciones de cultivo. Lively *et al.* (1995) identificaron el mismo tipo de estructuras de glicanos en el AcM CAMPATH-H1™ expresado por células CHO cuando fueron cultivadas en un biorreactor de fibras huecas utilizando medio de cultivo suplementado con 5 % de SFB y en un biorreactor tipo tanque agitado de 8000 L utilizando SFM. Sin embargo, la proporción de glicanos con galactosa terminal se incrementó considerablemente cuando las células fueron cultivadas en medio con SFB en comparación con el medio SFM. No obstante, sólo reportaron datos cualitativos, la cuantificación del contenido relativo de oligosacáridos no fue reportada. Recientemente, Cabrera *et al.* (2005) reportaron que la glicosilación de un AcM producido a baja concentración celular en frascos T-75 y “spinner” fue independiente del contenido de SFB, resultando en un alto grado de estructuras galactosiladas tipo G1 y G2 (ca. 60 % y 20 % respectivamente). En contraste, cultivos en sistemas de alta concentración celular como cartuchos de fibras huecas y miniPERM™ resultaron en una mayor heterogeneidad de la galactosilación que fue influenciada por cambios en el contenido de

SFB. Las estructuras más abundantes fueron tipo G₀ y fucosiladas. Los autores atribuyeron tales cambios en la glicosilación a la secreción de enzimas exoglicosidasas que disminuyeron el contenido de estructuras tipo G₁ y G₂, sin embargo, la determinación de actividad de enzimas exoglicosidasas en el medio de cultivo no fue realizada.

7. HIPÓTESIS

Los gradientes de las principales variables de cultivo (OD, pH y dCO_2) presentes en cultivos heterogéneos de células animales, tienen un impacto negativo importante en su desempeño y sobre el patrón de glicosilación de los AcM producidos.

8. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de los gradientes de OD, pH y dCO_2 presentes en cultivos heterogéneos de células animales, sobre el patrón de glicosilación y los principales parámetros cinéticos y estequiométricos del proceso de producción de AcM por cultivo de hibridomas.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Adaptar una línea celular de hibridomas modelo a crecer en medios de cultivo libres de suero fetal bovino y realizar una evaluación del patrón de glicosilación y los parámetros cinéticos y estequiométricos del proceso de producción del AcM en cultivos en los diferentes medios.

Evaluar el impacto de diferentes concentraciones de dCO_2 a pH y OD constante, sobre el patrón de glicosilación y los principales parámetros cinéticos y estequiométricos del proceso de producción de AcM por cultivo de hibridomas.

Evaluar el impacto de los gradientes de OD, pH y dCO_2 en un simulador de laboratorio de heterogeneidades ambientales, sobre el patrón de glicosilación del AcM producido por cultivo de hibridomas.

Evaluar el impacto de los gradientes de pH y dCO_2 en un simulador de laboratorio de heterogeneidades ambientales, sobre los principales parámetros cinéticos y estequiométricos del proceso de producción de AcM por cultivo de hibridomas.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 MODELO BIOLÓGICO

El hibridoma murino BCF₂ utilizado en este proyecto se derivó de una línea de ratones Balb/c. El AcM que produce dicho hibridoma es de clase G (IgG_{2a}), neutralizante y específico contra la toxina 2 del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. Dicha toxina es el péptido más tóxico del conjunto de toxinas presentes en el veneno. Este AcM inhibe la unión de la toxina con las membranas sinaptosomales del cerebro de ratón, mostrando así una actividad neutralizante *in vivo* (Zamudio *et al.*, 1992). La línea celular fue proporcionada por el Dr. Lourival Possani del Instituto de Biotecnología de la U. N. A. M. El AcM producido en ascitis de ratón (producción *in vivo*) fue proporcionado por la T. A. Sonia Rojas del Instituto de Biotecnología de la U. N. A. M.

9.2 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

Medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) • suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (Gibco, Carlsbad CA), 3.7 g L⁻¹ de bicarbonato de sodio, 4.5 g L⁻¹ de glucosa, 4 mM de glutamina y 0.8 mg L⁻¹ de insulina (todos de Sigma). Después de la adición del SFB, el medio de cultivo fue esterilizado por filtración a través de membranas Millipore™ de 0.22 μm de tamaño de poro y conservado en refrigeración a 4 °C por períodos de tiempo no mayores a un mes. El medio DMEM es un medio de cultivo químicamente definido que contiene todos los aminoácidos, vitaminas y sales minerales necesarias para el cultivo de hibridomas, sin embargo debe ser suplementado con SFB para proveer los

factores de crecimiento y otros compuestos indispensables, como lípidos, hormonas y elementos trazas, para que las células puedan vivir y duplicarse.

2. Serum Free Hybridoma Medium (SFM) (Gibco, Carlsbad, CA). Medio de cultivo comercial específico para el cultivo de hibridomas que no requiere de la adición de SFB para que las células puedan crecer. Sin embargo, entre sus componentes puede haber hidrolizados, proteínas u otros componentes de origen animal o vegetal. Este medio de cultivo no requiere adición de glucosa ni de glutamina y viene listo para ser usado.

3. Chemically Defined Hybridoma Medium (CDM) (Gibco, Carlsbad, CA). Es al igual que el medio SFM un medio de cultivo comercial específico para hibridomas libre de SFB, sin embargo el fabricante lo denomina como químicamente definido por no contener hidrolizados de proteína u otros componentes desconocidos de origen animal o vegetal. Este medio de cultivo únicamente debe ser suplementado con 8 mM de L-glutamina (Sigma, 3126, St. Louis, MO) para su uso.

Para llevar a cabo los cultivos de hibridomas en biorreactor a dCO_2 y pH tanto constante como oscilante se seleccionó el medio de cultivo CDM suplementado con 8 mM L-glutamina. Este medio de cultivo contiene 2.5 g L^{-1} de bicarbonato de sodio como amortiguador. Con la finalidad de establecer los diferentes niveles de dCO_2 y mantener el pH en 7.2 al inicio de los diferentes experimentos a dCO_2 y pH constantes, el medio de los cultivos a 12 mbar de dCO_2 fue suplementado con 25 mM de amortiguador HEPES y en los cultivos a 170 y 250 mbar de dCO_2 se aumentó la concentración de bicarbonato de sodio mediante la adición de 1.5 g L^{-1} y 3.2 g L^{-1} respectivamente (ambos reactivos de Sigma). En el caso de los cultivos a 50 mbar de dCO_2 y los cultivos a dCO_2 y pH oscilante, no se hizo ninguna modificación al medio.

9.3 MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS

9.3.1 CONGELACIÓN

1. Células creciendo en etapa exponencial en frascos T de 75 cm² (T-75) se centrifugaron a 700 g durante 10 minutos y el pellet celular fue resuspendido en el medio de cultivo correspondiente (sea CDM, SFM o DMEM suplementado con 40 % de SFB) para obtener una suspensión celular de 5 a 10×10^6 células viables mL⁻¹.
2. Se agregaron 900 µL de la suspensión celular a crioviales de 2 mL previamente colocados en hielo seco.
3. Se adicionaron 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma D2650) como agente crioprotector (10 % del volumen total) a cada vial.
4. Se colocaron los crioviales en congelador a -70 °C por 24 h.
5. Finalmente, los viales fueron colocados en nitrógeno líquido para preservar a -170 °C.

9.3.2 DESCONGELACIÓN

1. Se colocó 20 mL del medio correspondiente (CDM, SFM o DMEM sin SFB pH 7.2-7.4) en un tubo de centrífuga de 50 mL y se mantuvo a 4 °C.
2. Se descongeló el vial procedente del nitrógeno líquido, a temperatura ambiente lo más rápido posible.
3. Se extrajo la suspensión celular del vial y se resuspendió en el medio frío.
4. Se centrifugó a 700 g por 10 min.
5. Se eliminó el sobrenadante pipeteando por las paredes del tubo (en este paso se elimina el DMSO).
6. Se resuspendió el pellet celular en 10 mL de medio correspondiente (CDM, SFM o DMEM con 10% de SFB).
7. Se colocó en frascos T-75 y se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ y ambiente húmedo.

8. Se contó el número de células y se midió viabilidad a las 12 y 24 h para verificar crecimiento celular.
9. Si se verificó crecimiento, entonces se subcultivó a frascos T de 25 cm² (T-25) colocando 2.5 mL de células y 2.5 mL de medio fresco. Se repitió esta operación cada 24-48 h hasta que la viabilidad fuera igual o superior al 90 % cuidando que la concentración celular no fuera superior a 1.0×10^6 células viables mL⁻¹.
10. En adelante se subcultivó continuamente siguiendo el paso 9 para mantener a las células en crecimiento exponencial.

9.4 ADAPTACIÓN DEL HIBRIDOMA BCF₂ A CRECER EN MEDIOS DE CULTIVO LIBRES DE SUERO

Las células creciendo en medio DMEM fueron fácilmente adaptadas a crecer en los medios de cultivo CDM y SFM. Se realizó una adaptación en un sólo paso en frascos T-25. 5 mL de medio CDM o SFM fueron inoculados a una concentración de 0.5×10^6 células viables mL⁻¹ con células en crecimiento exponencial provenientes del medio DMEM a una concentración de 1.5×10^6 células viables mL⁻¹. Después de varios subcultivos las células alcanzaron una viabilidad superior al 90 % y fueron criopreservadas de acuerdo al protocolo antes descrito.

9.5 INÓCULOS

El inóculo para los cultivos realizados tanto en frascos T-75 (con 15 mL de medio de cultivo) como en biorreactor (con 250 mL de medio de cultivo) se preparó a partir de células en crecimiento exponencial (en frascos T-25 con 5 mL o T-75 con 15 mL) a una concentración celular de ca. 1.5×10^6 cel mL⁻¹, viabilidad superior al 90 % y con un número de pases no mayor a 20. Se tomó el volumen necesario para iniciar los cultivos a una concentración celular de 0.2×10^6 células viables mL⁻¹.

9.6 ESTRATEGIAS DE CULTIVO UTILIZADAS

9.6.1 EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL MEDIO DE CULTIVO

Se realizaron cultivos estáticos por triplicado en frascos T-75 conteniendo 15 mL de medio de cultivo, se incubaron a 37 °C en un ambiente con 5 % de CO₂ y aire húmedo. Todos los cultivos fueron inoculados a una concentración inicial de 0.2 x 10⁶ cel mL⁻¹ y se cosecharon cuando la viabilidad se encontraba alrededor del 40 %. Se tomaron volúmenes de muestra de 400 µL cada 12 h a cada frasco para la determinación de la concentración y viabilidad celular, concentración de AcM y análisis de metabolitos. El volumen final de medio de cultivo se utilizó para purificar el AcM y determinar su patrón de N-glicosilación por electroforesis capilar.

9.6.2 EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL dCO₂ Y pH

Para poder llevar a cabo la evaluación del comportamiento cinético del hibridoma BCF2 ante condiciones constantes y fluctuantes de dCO₂ y pH así como su impacto en el patrón de glicosilación del AcM, se implementó en el laboratorio un sistema de cultivo en biorreactor que permitió generar perfiles constantes u oscilantes de dCO₂ y pH en valores preestablecidos, manteniendo constantes el OD, temperatura y agitación.

El biorreactor (Figura 2) consistió en una jarra de 500 mL de volumen nominal (diámetro = 10 cm y altura = 7 cm) operado a 250 mL, resultando en una relación de altura del líquido/diámetro del tanque de 1/3. Con ello se logró una mayor área superficial para la transferencia de gases hacia el seno del líquido ya que la aireación fue exclusivamente superficial. Se utilizó una velocidad de agitación constante de 120 rpm mediante una barra magnética suspendida y un aireador superficial (paleta plana de acero inoxidable parcialmente sumergida). La temperatura se controló en 37 °C mediante una resistencia de calentamiento inmersa en el medio de cultivo vía un

termopozo. La temperatura y agitación se controlaron mediante una unidad de control independiente (Virtis Omni-Culture).

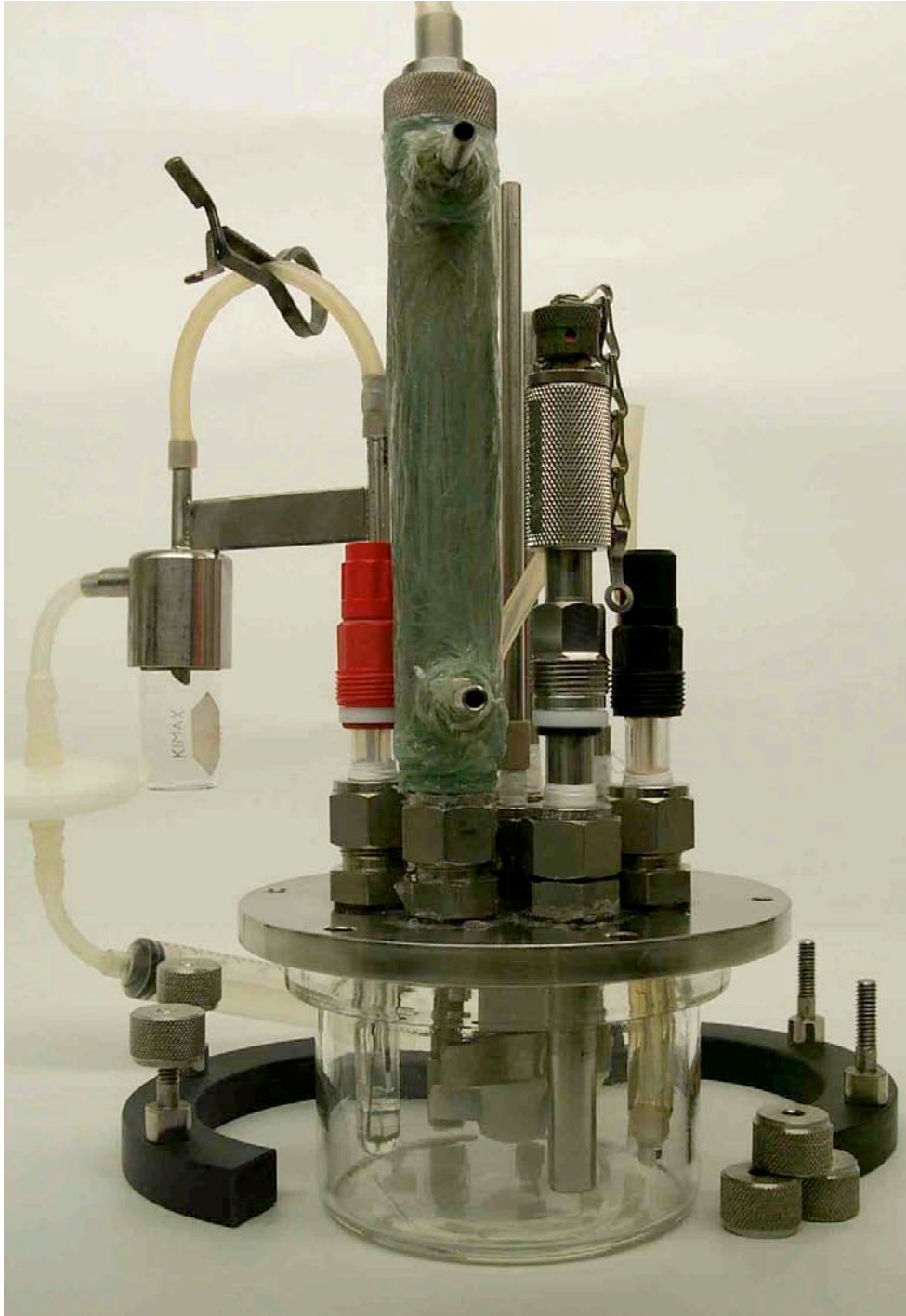


Figura 2. Biorreactor utilizado para el estudio de los efectos del dCO_2 y pH en valores tanto constantes como oscilantes.

El biorreactor se equipó con un electrodo de pH de vidrio, esterilizable (Mettler Toledo, Toledo OH); un electrodo polarográfico de OD, esterilizable de acero inoxidable (Ingold) y un electrodo de dCO₂ constituido por un electrodo de pH de vidrio no esterilizable acoplado a una funda esterilizable de acero inoxidable equipada con una membrana permeable al CO₂ (B&C electronics, Italia). El electrodo de dCO₂ fue calibrado con soluciones amortiguadoras estándar a base de bicarbonato de sodio con pH de 7.9 y 8.5 equivalentes a presiones parciales de dCO₂ de 5 y 80 mbar, respectivamente. El electrodo de pH fue calibrado con buffers estándar de 4 y 7 unidades de pH. El electrodo de OD fue calibrado en agua saturada con N₂ y aire burbujeado equivalentes a 0 y 100 % de OD (porcentaje de OD con respecto a saturación con aire), respectivamente. Todas las calibraciones fueron realizadas a 37 °C antes de cada cultivo. Mediante tales electrodos fue posible medir en línea el OD, pH y dCO₂ del seno del líquido.

El Sistema de control y adquisición de datos (SCAD) esta constituido por el sistema desarrollado originalmente por [Aguilar-Aguila *et al.* \(1993\)](#), más la incorporación de un equipo de medición de dCO₂ (amplificador y electrodo) y las modificaciones realizadas al programa de computadora ([listado en el Anexo](#)) para generar, controlar y adquirir perfiles de dCO₂ y pH constantes y oscilantes, manteniendo el OD constante. En el SCAD, una mezcla de N₂, O₂ y CO₂ es utilizada como flujo de gases de entrada al biorreactor. Los flujos de dichos gases son medidos y controlados por controladores de flujo másico (específicos para cada gas) (Brooks Instruments) conectados a una computadora Macintosh II SI mediante convertidores análogos/digitales de una interfase Mac ADIOS 411 (GW Instruments). Los amplificadores de las señales OD, pH y dCO₂ se encuentran igualmente conectados a dicha computadora. Así, mediante un programa de computadora escrito en lenguaje QuickBasic es posible además de adquirir, guardar y desplegar en pantalla las señales de OD, dCO₂ y pH, utilizarlas para manipular las

presiones parciales de O₂, N₂ y CO₂ con la finalidad de generar y mantener en el biorreactor condiciones constantes u oscilantes de dCO₂, pH y OD.

Se evaluaron cuatro condiciones a dCO₂ constante: 12, 50, 170 y 250 mbar, manteniendo constantes el pH en 7.2 (mediante la adición de NaOH 0.4 N) y el OD al 50 % en todos los cultivos.

Como se observa en la **Tabla 1**, se evaluaron tres condiciones a dCO₂ y pH oscilante con periodos, amplitudes y ejes de oscilación diferente, manteniendo constante el OD a 50 %.

Tabla 1. Condiciones de cultivo a dCO₂ y pH oscilante.

Periodo de oscilación	Amplitud de oscilación de pH	Eje de oscilación de pH	Amplitud de oscilación de dCO ₂	Eje de oscilación de dCO ₂
1800 s	± 0.2	7.1	± 20 mbar	50 mbar
3600 s	± 0.3	7.1	± 30 mbar	45 mbar
7200 s	± 0.5	7.3	± 90 mbar	90 mbar

Las condiciones oscilatorias de dCO₂ y pH se generaron mediante variaciones del flujo de CO₂ a la entrada del biorreactor siguiendo un perfil de onda cuadrada y dejando oscilar el pH libremente.

Todos los cultivos fueron finalizados a una viabilidad aproximada al 80 %, excepto para los cultivos a 250 mbar donde se finalizaron aproximadamente al 60 %. Se tomaron muestras de 1 mL cada 12 h para la determinación de concentración celular, viabilidad, concentración de AcM y análisis de metabolitos. El volumen final de medio de cultivo se utilizó para purificar el AcM y determinar su patrón de N-glicosilación.

Cada condición de cultivo se realizó por duplicado.

9.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

9.7.1 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR

Las concentraciones celulares se determinaron mediante un contador electrónico de partículas (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics) utilizando un tubo de apertura de 100 μm y aspirando para cada muestra un volumen de 500 μm . Para diluir las muestras y con la finalidad de no tener variaciones de tamaño debido a cambios en la osmolaridad, se utilizó una solución isotónica (Isotón II, Coulter, 7546719). El número de células arrojado por el equipo está expresado en células por 500 μL , para lo cual se multiplicaron los valores por dos para expresarlo en cel mL^{-1} y finalmente se multiplicó por la dilución realizada. Es importante realizar diluciones de la muestra para que el error de lectura del equipo no rebase un 10 %.

9.7.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión por medio del colorante azul de tripano (Sigma T8154) (solución al 20 % en PBS). El colorante es un indicador de la integridad de la membrana citoplasmática. Mediante esta tinción, las células muertas son permeables al colorante y se tiñen de azul, mientras que las vivas permanecen refringentes. La cuantificación se realizó en un hemacitómetro, con un microscopio óptico (Fisher Micromaster) utilizando el objetivo y ocular de 10x de acuerdo al procedimiento reportado por Freshney (1983). En los experimentos realizados en frascos T-75 se utilizó esta técnica para determinar tanto la viabilidad como la concentración celular dado el bajo volumen de muestra.

9.7.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ACM EN LOS CULTIVOS

La concentración de AcM se determinó mediante la capacidad de unión antígeno del AcM a través de un ensayo inmunoenzimático ELISA (Serrato, 2002) en placas de 96 pozos (Costar[®] 3590, Flat bottom, No lid, Polyestylene high binding):

1. Se colocó en cada pozo 100 μL de AcM de conejo anti-ratón [2ml Zymed Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) Cat. 61-6500] a una concentración de 0.01 mg mL^{-1} en buffer de fosfatos (PBS pH 7.2-7.3) y se incubó de 16 a 18 h a 4 °C. La composición del PBS fue 8.75 g NaCl/L, 2.25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{L}$, 0.20 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$ y 0.20 g KCl/L. En este paso el AcM se adhirió al fondo del pozo.
2. Se lavó cada pozo dos veces con 150 μL de PBS/Tween 20. Esta solución de lavado se prepara disolviendo 0.50 mL de Tween 20 en un litro de PBS.
3. Se colocó a cada pozo 125 μL de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma A-7638), a una concentración de 10 mg mL^{-1} en PBS y se incubó dos horas a temperatura ambiente. En este paso se bloquearon los sitios activos remanentes.
4. Se repitió el paso número 2.
5. Se colocó en cada pozo 100 μL de PBS en la primera hilera (blanco 1) y 100 μL de solución estándar en las siguientes dos hileras (controles internos 2 y 3). Como estándar se utilizó AcM BCF₂ purificado de una concentración conocida preparados con PBS a 25 ng mL^{-1} y 50 ng mL^{-1} , respectivamente. En las hileras restantes (4 a 12), se colocó a cada pozo 100 μL de las muestras problema a determinar en una dilución 1/200 con PBS, de manera que las concentraciones de AcM determinadas fueran menores a 100 ng mL^{-1} . Se dejó incubando a temperatura ambiente durante dos horas. En este paso se unió el primer ligando al AcM a determinar.
6. Se repitió el paso 2, pero ahora tres veces en lugar de dos.

7. Se colocó en cada pozo y a toda la placa 100 μL de AcM de borrego anti-ratón conjugado con alcalino fosfatasa [Alkaline phosphatase-conjugated Affinipure Sheep Anti-Mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Labs., Inc., Cat. 515-055-003] y se dejó incubando a temperatura ambiente durante dos horas. Este AcM se preparó a 0.12 mg mL^{-1} con PBS. En este paso se unió el ligando detector al ligando problema.

8. Se repitió el paso 6.

9. Se colocó en cada pozo y a toda la placa 100 μL de PNPP (Paranitrofenol fosfato) (Sigma 104 Phosphatase Substrate) en solución de DEA (Dietanolamina) (Sigma 2286) a una concentración de 120 mg mL^{-1} y a los 20 min exactos se agregó 100 μL de NaOH 2 N para detener la reacción enzimática. La DEA se preparó disolviendo 10 mL de DEA, 0.20 g de $\text{MgCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$ y 0.29 g de azida de sodio (NaN_3) en 890 mL de agua destilada; el pH se ajustó a 9.8 con HCl y se aforó a un litro. En este paso se reveló la actividad enzimática, la cual se percibió por la coloración amarilla generada en este paso.

10. Se leyó absorbancia a una longitud de onda de 405 nm y se determinaron las concentraciones de AcM, considerando las diluciones realizadas. Los platos de ELISA fueron leídos en un lector Elx-800 UV (Bio Tek Instruments, Inc.) y las concentraciones de AcM obtenidas fueron el promedio de 8 pozos.

9.7.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA, LACTATO Y GLUTAMINA

Estos tres metabolitos se determinaron enzimáticamente en un multianalizador enzimático YSI modelo 2700 (Yellow Spring Instruments, Co., OH). Este analizador utiliza membranas con enzimas inmovilizadas: glucosa oxidasa para determinar glucosa, L-lactato oxidasa para lactato, glutaminasa/L-glutamato oxidasa para glutamina y L-glutamato oxidasa para glutamato. Las enzimas catalizan la reacción oxidativa entre la

muestra a determinar y el oxígeno, formando un derivado y peróxido de hidrógeno, este último es oxidado en el ánodo de platino de una sonda, generándose una corriente eléctrica que es linealmente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y ésta, a su vez, de la concentración del metabolito medido. Finalmente, utilizando un estándar de concentración conocida que producirá una corriente eléctrica determinada, es posible conocer la concentración de la muestra problema.

9.7.5 PURIFICACIÓN DEL AcM

Al finalizar los cultivos, se recolectó el medio de cultivo con células y se centrifugó a 4000 rpm por 15 min en una centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, AG) para separar las células. El sobrenadante se filtró a través de membranas Millipore™ de 0.45 µm para eliminar sólidos suspendidos. Posteriormente, el filtrado se concentró a un volumen de 1 mL en Centricon® (Millipore Corp., MA) con un corte molecular de 100 kDa y se equilibró con 4 mL de buffer de unión (fosfato de sodio dibásico 20 mM pH 7). Finalmente, el AcM colectado del sobrenadante al final de los cultivos, fue purificado utilizando un equipo de cromatografía de baja presión ÄKTA *prime* (GE Healthcare, UK) por cromatografía de afinidad con una columna de Proteína A-Sepharose (GE Healthcare, UK). De acuerdo a los protocolos de purificación de AcM reportados para análisis de glicanos (Kunkel *et al.*, 1998) se utilizó como buffer de unión fosfato de sodio como arriba descrito, como buffer de elusión glicina-HCl 0.1 M pH 2.7 y buffer de neutralización Tris-HCl 1 M pH 9 (todos de Sigma). Para desalar el AcM purificado se utilizaron unidades de filtración Centricon® de 2mL de capacidad con un corte molecular de 10 kDa.

La pureza del AcM fue analizada por SDS-PAGE al 12 %.

9.7.6 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ACM PURIFICADO

La concentración del AcM purificado fue determinada espectrofotométricamente en un equipo Beckman DU 650 (Beckman-Coulter, Ca.). Se determinó mediante el empleo del kit de análisis basado en el método de Bradford (1976) utilizando IgG bovino como estándar (Bio-Rad, Hercules CA.) o por absorbancia de los aminoácidos aromáticos a 280 nm, considerando un coeficiente de extinción de 1.4, en celda de cuarzo con un cm de longitud de paso de luz.

9.7.7 DETERMINACIÓN DE LA OSMOLALIDAD

La osmolaridad de las muestras fue determinada utilizando un Osmómetro Osmomat 030 (Gonotec, GmbH) cuyo principio de medición está basado en el punto de congelación de la muestra.

9.8 CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y CONSIDERACIONES MATEMÁTICAS

9.8.1 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO, VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PRODUCCIÓN DE ACM Y COEFICIENTES METABÓLICOS DE GLUCOSA, LACTATO Y GLUTAMINA

Todos los cálculos se realizaron utilizando la velocidad específica de crecimiento aparente (μ). Dicha velocidad es el resultado de restarle a la tasa de crecimiento real la tasa de muerte. La μ fue determinada en la fase de crecimiento exponencial, donde:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1.1)$$

Integrando:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t \quad (1.2)$$

donde X y X_0 son la concentración de células viables al tiempo t y al inicio del cultivo, respectivamente. La μ se calculó a través de la regresión lineal obtenida de la gráfica de $\ln(X/X_0)$ contra tiempo.

Los coeficientes metabólicos de glucosa, lactato y glutamina se determinaron mediante la ecuación:

$$q_i = \frac{\mu}{Y} \quad (1.3)$$

donde Y es el rendimiento de células viables con respecto al metabolito o nutrimento de interés y se calculó como la pendiente de la regresión lineal (en la fase exponencial de crecimiento) entre la concentración de células viables y el nutrimento o metabolito “ i ”.

La velocidad específica de producción de AcM fue determinada mediante la pendiente de la regresión lineal generada de la gráfica de concentración de AcM y el índice de viabilidad. El índice de viabilidad ($\int x dt$) se determinó

como el área bajo la curva de concentración de células viables contra tiempo, usando el método integral de los trapecios, de acuerdo a lo reportado anteriormente por [Luan et al. \(1987\)](#) y [Ramírez y Mutharasan \(1990\)](#).

9.9 ANÁLISIS DE LA MICRO Y MACROHETEROGENEIDAD DE LA GLICOSILACIÓN DEL ACM

9.9.1 ANÁLISIS POR HPLC DE FASE NORMAL

Se determinó el patrón de N-glicosilación de los AcM producidos por hibridomas en cultivos de OD constante, OD oscilante (800 s, 1600 s, 6400 s y 12800 s) ([Serrato, 2002](#)) y la muestra de AcM producido en ascitis de ratón (como control de producción *in vivo*), utilizando la metodología de HPLC-Fase Normal descrita por [Guile et al. \(1997\)](#) y [Palomares et al. \(2003\)](#).

1. Se procesaron 100 µg de proteína de cada muestra en 32.5 µL de buffer de fosfato.
2. Para asegurar una completa desglicosilación de la proteína, ésta se desnaturalizó previamente (eliminación de estructura secundaria y terciaria que pudiera impedir el libre acceso de la enzima por su sustrato) con una solución de SDS-β-mercaptoetanol y hervida por 5 min. Posteriormente se adicionó IGEPAL 630 al 7 %, buffer para PNGasa-F y agua ultrapura. Todos los reactivos fueron de Sigma.
3. Se llevó a cabo la desglicosilación enzimática de la proteína mediante la digestión con 1 unidad de PNGasa-F (N-Glicosidasa-F 1 U µL⁻¹ de *Elizabethkingia meningosepticum*, Calbiochem 362185) e incubando por 15 h a 37 °C. Se utilizó la digestión enzimática con PNGasa-F en vista de que ha mostrado ser el método más efectivo para la remoción intacta y completa de los N-glicanos unidos a las glicoproteínas. La PNGasa-F libera todos los tipos de N-oligosacáridos (complejos, híbridos y altos en manosa) excepto los que tienen fucosa en enlace α[1-3] con la primera N-acetilglucosamina

del núcleo de quitobiosa (oligosacáridos encontrados comúnmente en glicoproteínas de plantas).

4. Con la finalidad de tener un control interno de concentración conocida de glicanos en la muestra, se adicionó 100 pmol de maltosa (Sigma, M9171) a cada muestra.

5. Se procedió a eliminar la proteína de los glicanos liberados, precipitándola con etanol absoluto a -20 °C y llevando los glicanos a sequedad en un Concentrador SAVANT SC110A (Thermo Fisher Sc., MA).

6. Una vez que se tenían a los glicanos libres de proteína y a sequedad, se derivatizaron en su extremo amino reductor con el colorante fluorescente 2-aminobenzimida (2-AB Prozyme GKK-404, San Leandro CA) mediante una reacción de aminación reductiva a 65 °C durante 2 h (Thermo Stat plus, Eppendorf) y posteriormente se congeló a -20 °C por 30 min. A diferencia de las proteínas, los oligosacáridos no absorben fuertemente luz UV. Los glicanos marcados resultantes pueden entonces ser detectados, separados y cuantificados. El uso de este método tiene varias ventajas: es seguro, aumenta considerablemente la sensibilidad de detección pudiendo identificar concentraciones picomolares de oligosacáridos, la pérdida de ácidos siálicos es despreciable y finalmente dado que el marcado se da en una relación de una molécula de colorante por una molécula de glicano, la intensidad de fluorescencia de un pico de oligosacárido detectado estaba directamente relacionada con un determinado número de moléculas, haciendo al método cuantitativo.

7. Se lavó el exceso de colorante. Muchos contaminantes hidrofóbicos (no glicanos), entre ellos el exceso de colorante pasaron a través de una membrana utilizando acetonitrilo, después se eluyeron y se recuperaron los glicanos marcados pasando agua a través de esta membrana. Se realizó utilizando cartuchos GlycoClean™ S (Prozyme) o papel filtro Whatman No. 1 (GE Healthcare, UK) tratados sobre tubos de 50 mL con la tapa perforada y con el siguiente protocolo:

a. Lavar con: 1 mL de agua, 5 mL de ácido acético 30% (JT-BAKER 0129-01), 1 mL acetonitrilo 100 % (Burdick & Jackson, cat. CE097, NJ). No dejar secar el cartucho.

b. Poner la muestra en el centro del disco. Dejar la punta en el vial para lavar. Agregar 15 μL de acetonitrilo 100 % a cada tubo vacío y ponerlos en el disco con la primera punta.

c. Dejar absorber por 15 min.

d. Lavar el vial de la muestra con 100 μL de acetonitrilo 100 % y poner en el cartucho.

e. Lavar el cartucho con 1 mL de acetonitrilo 100 %, seguido de 5 x 1 mL acetonitrilo 96 %.

f. Poner cada cartucho sobre un tubo de 2 mL con rosca y eluir los glicanos con 4 x 0.5 mL de agua ultrapura. Congelar y concentrar en SAVANT a menos de 100 μL .

g. Llevar los azúcares a 100 μL con agua (1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína original).

h. Guardar todas las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8. Se procedió al análisis, identificación y cuantificación de glicanos-2AB. Para la cromatografía de fase normal en HPLC se requirió una columna con grupos funcionales polares los cuales interaccionaron con los grupos hidroxilo de los azúcares. La muestra de glicanos-2AB se inyectó al cromatógrafo en una alta concentración de solvente orgánico (80 % acetonitrilo – 20 % formato de amonio) donde se absorbieron a la superficie de la columna y fueron posteriormente eluidos bajo un gradiente acuoso. De esta forma los glicanos fueron removidos de la columna y por tanto separados en base a su hidrofiliidad; los glicanos más pequeños con menos grupos hidroxilo (menos hidrofílicos) eluyeron a bajas concentraciones de solvente acuoso y por tanto antes que los glicanos más grandes (más hidrofílicos). De acuerdo a lo anterior, los glicanos se analizaron mediante un sistema HPLC (controlador 600S, bombas 626, degasificador en línea AF, autoinyector 717plus marca Waters y software Empower® (Milford,

MA)) fase normal utilizando una columna amido (TSKgel Amide-80 TOSOH Bioscience), con un gradiente de acetonitrilo y formato de amonio 25 y/o 250 mM pH 4.4 en corridas de 180 min a 30 °C. Se utilizó un detector de fluorescencia (2475 Waters) a una longitud de onda de 330 nm de excitación y de 420 nm emisión, óptimas del 2-AB. En una corrida se inyectó el volumen de glicanos correspondiente a 5 µg de proteína. Vale la pena recalcar que las muestras ya no contenían proteína, sino sólo los azúcares correspondientes a 5 µg de proteína. En el análisis de los datos de la corrida cromatográfica se determinó el tiempo de retención, el área y % de área de cada pico y el área total de glicanos del cromatograma. Con los resultados obtenidos se pudo llevar a cabo un análisis de la microheterogeneidad (caracterización de todas las estructuras de N-glicanos en la proteína) y macroheterogeneidad de la glicosilación (número de moles de oligosacáridos por mol de proteína).

9. Se procedió a la caracterización estructural de los picos obtenidos (microheterogeneidad). Los glicanos se identificaron según su migración en unidades de glucosa (UG) de acuerdo a la comparación de sus tiempos de retención con los de un homopolímero estándar de dextrana (escalera de glucosa-2AB, Sigma, D3818), véase Figura 3.

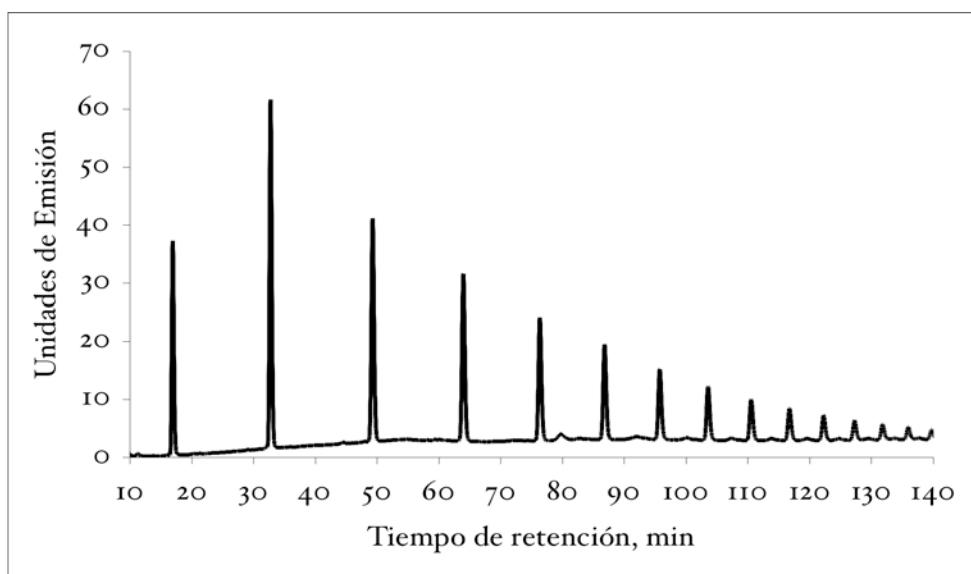


Figura 3. Perfil cromatográfico de la escalera de dextrana a 250 mM de formato de amonio en HPLC-Fase Normal.

El tiempo de retención de cada polímero de glucosa se graficó contra su valor de unidades de glucosa y mediante una regresión polinomial de tercer orden se obtuvo la ecuación para convertir los tiempos de retención de los picos identificados a UG. Véase Figuras 4 y 5.

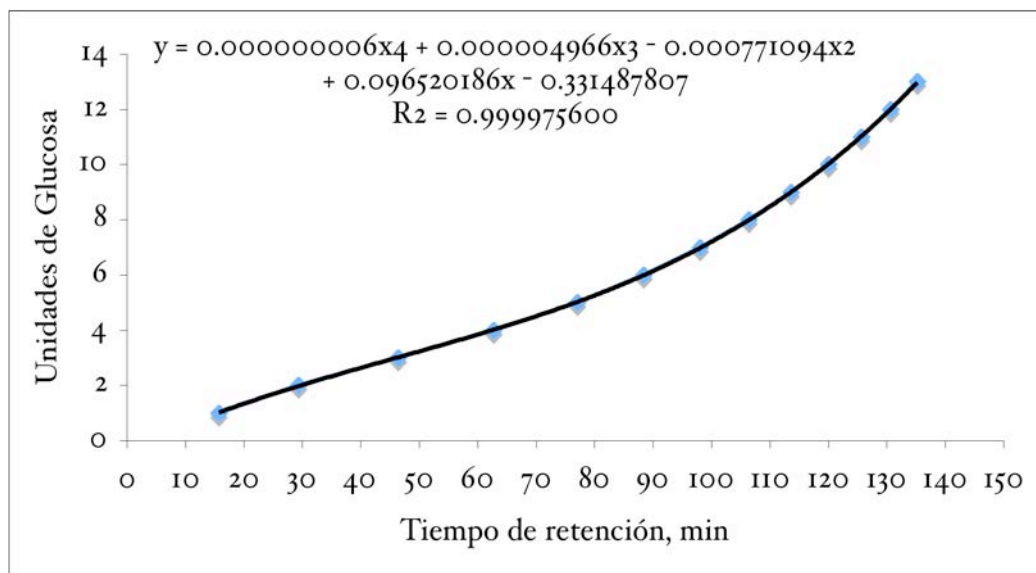


Figura 4. Curva para la conversión de tiempo de retención a unidades de glucosa utilizando 25 mM de formato de amonio en HPLC-Fase Normal.

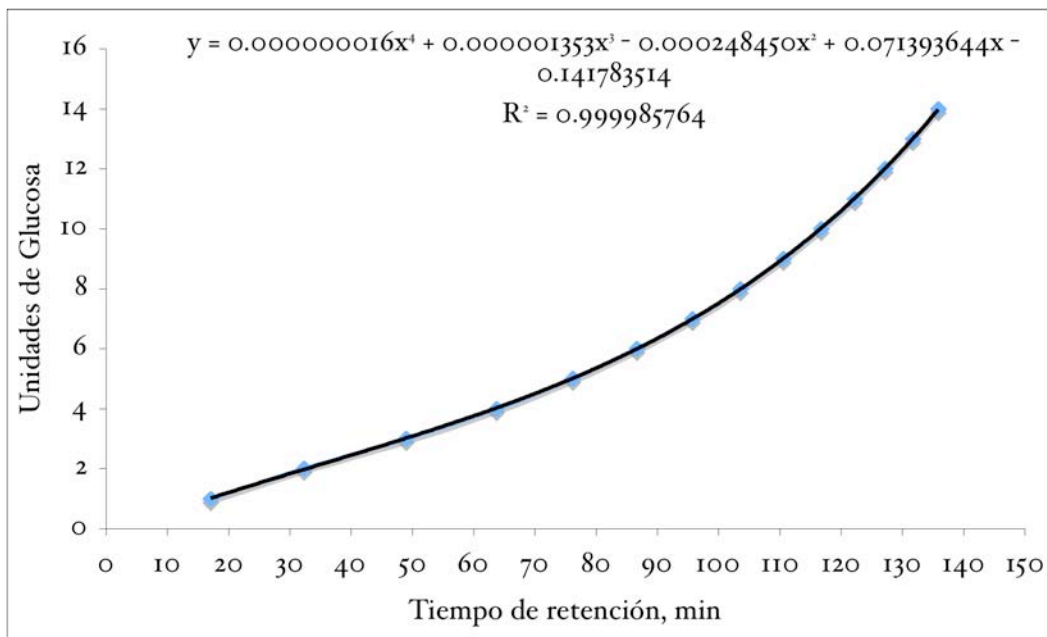


Figura 5. Curva para la conversión de tiempo de retención a unidades de glucosa utilizando 250 mM de formato de amonio en HPLC-Fase Normal.

10. El siguiente paso consistió en someter a la muestra a digestiones independientes con enzimas exoglicosidasas específicas: β -galactosidasa (Prozyme X-5012) para identificar los picos con galactosas terminales, α -fucosidasa (Prozyme X-5006) para identificar los picos con fucosas unidas en enlace α 1-6 a la primera GlcNAc del núcleo de quitobiosa, β -hexosaminidasa (Prozyme X-5003) para identificar los picos con GlcNAc terminal, sialidasa (Prozyme X-5021) para identificar los picos con ácidos siálicos terminales y finalmente con α -manosidasa (Prozyme X-5010) para identificar a los picos con manosas terminales. La incubación se realizó durante 18 h a 37 °C, después se eliminó la enzima y se analizaron en el HPLC. Los picos susceptibles a la acción de las exoglicosidasas experimentarán un cambio en su tiempo de retención con respecto al determinado para la muestra sin tratamiento.

11. Finalmente, fue posible proponer estructuras para cada uno de los picos identificados utilizando bases de datos de estructuras publicadas en la literatura bajo las mismas condiciones cromatográficas (Guile *et al.* 1997, Palomares *et al.* 2003, GlycoBase del NIBRT (<http://glycobase.ucd.ie/cgi-bin/public/glycobase.cgi>). Se debe de tener en cuenta que se trata de estructuras propuestas y además varias estructuras pueden co-migrar y estar presentes en el mismo pico. Para identificar plenamente cada estructura se podría coleccionar cada pico y tratarlo independientemente con una batería de exoglicosidasas en conjunto con un análisis de espectrometría de masas.

12. Con el análisis cromatográfico fue posible realizar también la determinación del contenido de moles de glicanos presentes por mol de proteína (macroheterogeneidad). Para ello fue necesario una curva estándar de concentración de maltosa-2AB contra área bajo la curva. El área total que comprende todos los picos detectados en una muestra fue interpolado en dicha curva estándar de maltosa, para conocer el contenido total de glicanos por cantidad de proteína.

9.9.2 NOMENCLATURA DE LOS OLIGOSACARIDOS

Para los azúcares complejos (sin manosa terminal) se utilizó la siguiente nomenclatura:

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

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

G# Indica el número de galactosas.

F (después de G) Indica galactosa fucosilada.

S# Indica el número de ácidos siálicos. Hasta el momento no hemos identificado cuál es el tipo de ácido siálico (N-acetil neuramínico o N-glicolil neuramínico) presente en los glicanos analizados.

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

9.9.3 ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Para la determinación del patrón de N-glicosilación de los AcM producidos por hibridomas en el estudio del efecto del medio de cultivo y en cultivos de dCO₂ constante y oscilante y pH se utilizó la metodología de Electroforesis Capilar (EC) descrita por Ma y Nashabeh (1999) y Guttman (1997).

Con dichas metodologías se logró cuantificar la proporción de cada una de las estructuras de los oligosacáridos (glicanos) obtenidos.

1. Se procesaron 100 µg de proteína de cada muestra en 45 µL de buffer de fosfato.
2. Para asegurar una completa desglicosilación de la proteína, ésta se desnaturalizó previamente (eliminación de estructura secundaria y terciaria que pudiera impedir el libre acceso de la enzima por su sustrato) con una solución de SDS-β-mercaptoetanol y hervida por 5 min. Posteriormente se adicionó IGEPAL 630 al 7 %, buffer para PNGasa-F y agua ultrapura. Todos los reactivos fueron de Sigma.
3. Se llevó a cabo la desglicosilación enzimática de la proteína mediante la digestión con 1 unidad de PNGasa-F (N-Glicosidasa-F 1 U µL⁻¹ de *Elizabethkingia meningosepticum*, Calbiochem 362185) e incubando por 15 h a 37 °C.
4. Con la finalidad de tener un control interno de concentración conocida de glicanos en la muestra, se adicionó 2 nmol de maltosa (G22 Beckman-Coulter Fullerton, CA, USA.) a cada muestra.

5. Se procedió a eliminar la proteína de los glicanos liberados, precipitándola con etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y llevando los glicanos a sequedad en un Concentrador SAVANT SC110A.
6. Una vez que se tuvieron a los glicanos libres de proteína y a sequedad, se derivatizaron en su extremo amino reductor con el colorante fluorescente ácido 8-aminopireno 1,2,6-trisulfonato (APTS, 477602 Beckman-Coulter) en ácido acético al 15 % mediante una reacción de aminación reductiva con 2 μL de cianoborohidruro de sodio 1 M en tetrahidrofurano a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h (eCAP carbohydrate labelling and analysis kit Beckman Coulter). El marcado se dió en una relación de una molécula de colorante por una molécula de glicano, la intensidad de fluorescencia de un pico de oligosacárido detectado estaba directamente relacionada con un determinado número de moléculas, haciendo al método cuantitativo. Para detener la reacción se adicionó 46 μL de agua desionizada.
7. Se procedió al análisis, identificación y cuantificación de glicanos-APTS. Los glicanos marcados se analizaron por electroforesis capilar utilizando un sistema P/ACE™ MDQ de Beckman-Coulter equipado con laser de argón 3 mW y detector LIF (fluorescencia inducida por láser) (Beckman-Coulter Fullerton, CA, USA) con una longitud de onda de 488 nm de excitación y de 520 nm de emisión. Se utilizó un capilar eCAP N-CHO (capilar cubierto con flujo electroosmótico reducido) de 50 μm de diámetro interno y 48.5 cm de longitud (38.5 cm longitud efectiva al detector) de Beckman-Coulter y el software 32Karat® (Estrada-Mondaca, *et. al.*, 2005).
8. Las muestras de glicanos se introdujeron hidrodinámicamente por 10 s a 3.45 kPa y la separación se realizó en polaridad reversa (con el ánodo en el detector) en un campo eléctrico constante de $515.4\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entre cada corrida se lavó el capilar con buffer-N para separación de carbohidratos (477623 Beckman-Coulter) a 138 kPa durante 2 min.
9. Se procedió a la caracterización estructural de los picos obtenidos (microheterogeneidad). Para relacionar el tiempo de migración de los

glicanos a valores de UG se corrió un estándar de homopolímero de glucosa (escalera de dextrana G20 Beckman-Coulter), véase Figura 6.

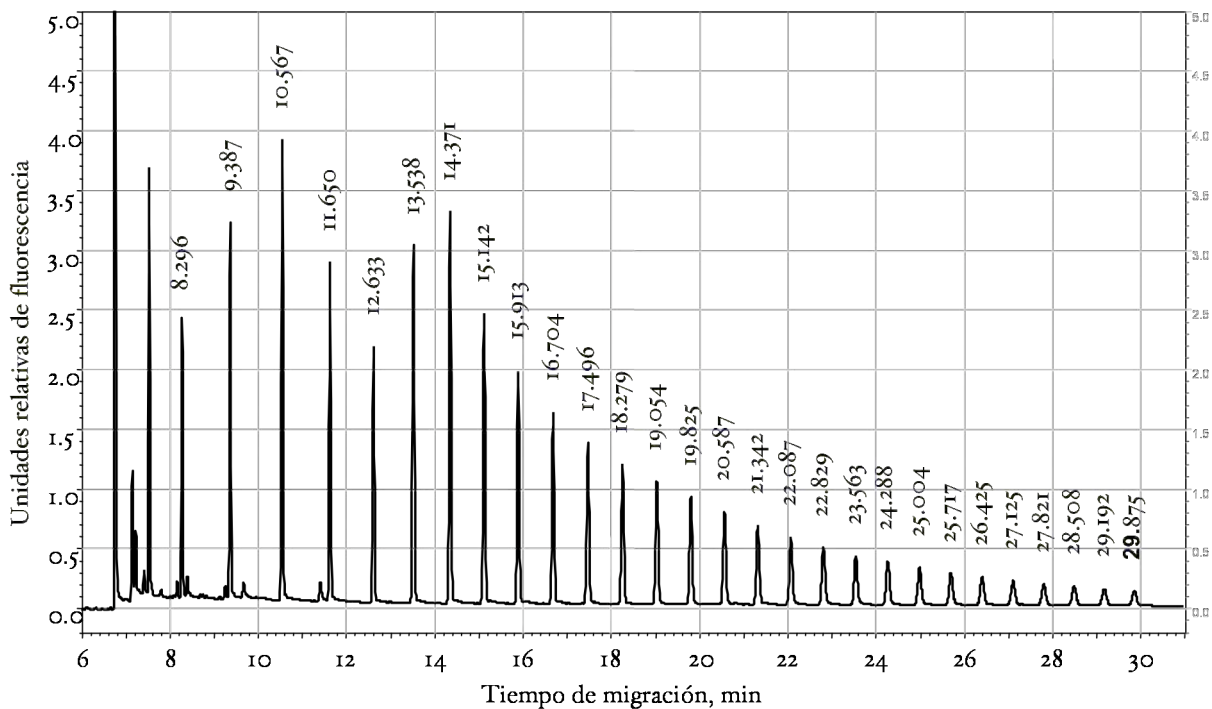


Figura 6. Migración de la escalera de dextrana por EC. El estándar de glicanos se introdujo hidrodinámicamente por 10 s a 3.45 kPa y la separación se realiza en polaridad reversa en un campo eléctrico constante de $515.4 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ a $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Los números representan el tiempo de migración de cada pico.

El tiempo de migración de cada polímero de glucosa se graficó contra su valor de UG y mediante una regresión polinomial de tercer orden se obtuvo la ecuación para convertir los tiempos de migración de los picos identificados a UG, véase Figura 7.

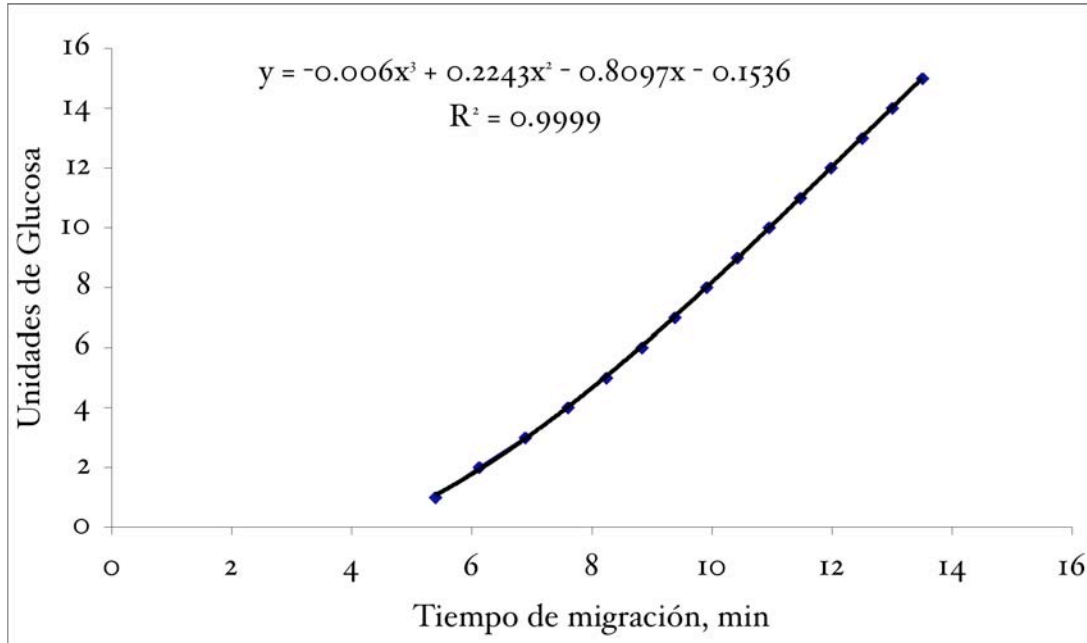


Figura 7. Curva para la conversión de tiempo de migración a unidades de glucosa utilizando EC.

En el caso de análisis por electroforesis capilar, la separación está basada en la diferencia en la velocidad de migración de los glicanos; por lo tanto los glicanos más lentos tomaron más tiempo para pasar a través de la ventana del detector que los glicanos más rápidos. Consecuentemente, el área de cada pico no sólo depende de la concentración del analito sino también de su velocidad de migración. Para contender con este fenómeno, se calculó el CPA (corrected peak area) para cada glicano multiplicando el área del pico por su propia velocidad de migración. El porcentaje relativo de CPA para cada glicano se calculó dividiendo su CPA por la suma del CPA de todos los glicanos.

10. El siguiente paso consistió en someter a la muestra a digestiones independientes con enzimas exoglicosidasas específicas: β -galactosidasa (Prozyme X-5012), α -fucosidasa (Prozyme X-5006), β -hexosaminidasa (Prozyme X-5003), sialidasa (Prozyme X-5021) y α -manosidasa (Prozyme X-5010). La incubación se realizó durante 18 h a 37 °C, después se eliminó la

enzima y se analizó por CE. Los picos susceptibles a la acción de las exoglicosidas experimentaron un cambio en su tiempo de migración con respecto al determinado para la muestra sin tratamiento.

11. Finalmente, fue posible proponer estructuras para cada uno de los picos identificados utilizando bases de datos de estructuras publicadas en la literatura bajo las mismas condiciones cromatográficas (Prozyme®; Ma y Nashabeh, 1999). Se debe de tener en cuenta que se trata de estructuras propuestas y además varias estructuras pueden co-migrar y estar presentes en el mismo pico.

La nomenclatura fue la misma que la utilizada en HPLC-Fase Normal.

12. Se procedió a la determinación del contenido de moles de glicanos por mol de proteína (macroheterogeneidad). El contenido relativo de glicanos por mol de AcM (ocupación de sitios glicosilados) se determinó por la interpolación del valor total de CPA de todos los glicanos detectados en cada electroferograma (excluyendo la maltosa) en una curva estándar de maltosa-APTS, véase Figura 8.

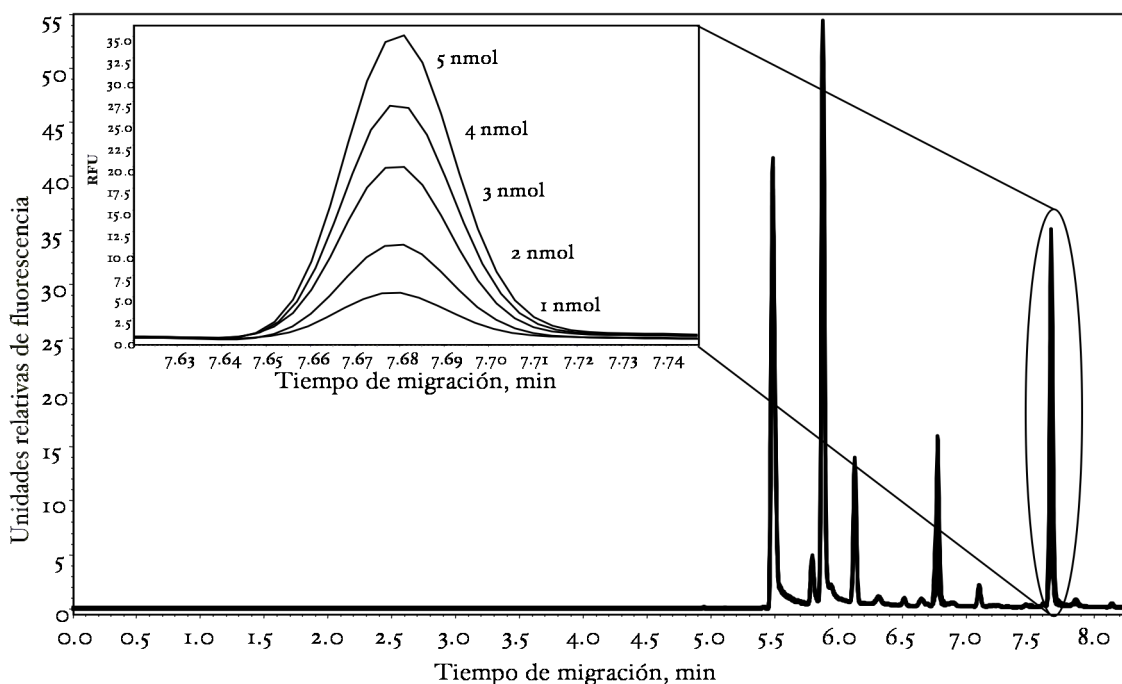


Figura 8. Curva estándar de maltosa-APTS por EC. Cada pico representa una concentración de maltosa (1, 2, 3, 4 y 5 nmoles), mostrada en el recuadro.

9.10 DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXOGLICOSIDASAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVO

Las actividades enzimáticas extracelulares β -galactosidasa, β -N-Acetilhexosaminidasa y α -manosidasa se determinaron en el sobrenadante de los cultivos de hibridomas realizados en frascos T-75 con los tres diferentes medios de cultivo: CDM, SFM y DMEM-SFB. Se utilizó el método reportado por **Gramer y Gooche (1993, 1994)**.

1. Se preparó una curva de calibración por diluciones seriales de 4-methylumbelliferone (4-MU) (Sigma, M1381). El 4-MU sólo es soluble en metanol o ácido acético glacial. Primero se solubilizó el 4-MU en el volumen más bajo posible de ácido acético y después se diluyó a el volumen deseado con buffer de reacción (acetato de sodio 0.1 M / HCl pH6). Se realizaron las diluciones seriadas. Se adicionó 10 μ L de cada dilución a la celda para espectrofluorímetro y se llevó el volumen a 3 mL con buffer para detener reacción (glicina 0.2 M pH 10.5) (nosotros pusimos 3 mL en cada celda, removimos 10 μ L de buffer y adicionamos 10 μ L de la solución de 4-MU). Se leyó la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 362 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm utilizando una apertura de 5 nm. Fue recomendable realizar la curva de calibración con concentraciones de 4-MU entre 3 y 270 nM. Para leer la fluorescencia se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer Ins. LS 55 (Waltham, MA. USA).

2. Se adicionó 10 μ L de cada muestra de sobrenadante a 90 μ L de la solución de sustrato y se incubó a 37 °C por 1 h. Se detuvo la reacción por la adición de 900 μ L del buffer para detener reacción y posteriormente se llevó la reacción a un volumen final de 3 mL y se leyó la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 362 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm utilizando una apertura de 5 nm. Se diluyó cuando se requería. Se utilizaron los siguientes sustratos todos de Sigma: para determinar actividad β -galactosidasa, 4-methylumbelliferyl β -D-galactoside (M1633); para

determinar actividad β -N-acetilhexosaminidasa, 4-methylumbelliferyl β -N-D-acetylglucosaminide (M2133); para determinar actividad α -manosidasa, 4-methylumbelliferyl α -D-mannopyranoside (M3657). Sobrenadantes sin sustrato se utilizaron como controles.

3. Se compararon e interpolaron los valores obtenidos con la curva estándar, se determinaron las concentraciones y las actividades enzimáticas correspondientes (U mL^{-1} a pH 6 y 37°C).

10. RESULTADOS Y DISCUSIONES

10.1 EFECTO DE LAS OSCILACIONES DE OD SOBRE EL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DEL AcM PRODUCIDO POR EL HIBRIDOMA BCF₂ CULTIVADO *IN VITRO* A DIFERENTES PERIODOS DE OSCILACIÓN

En el estudio realizado por Serrato (2002) se determinó el efecto en el crecimiento y metabolismo celular así como en la producción de AcM al cultivar el hibridoma BCF₂ bajo condiciones oscilatorias de OD. Serrato (2002) realizó cultivos con fluctuaciones oscilatorias sinusoidales de OD a 800, 1600, 6400 y 12800 segundos de periodo de oscilación (manteniendo constante el eje y amplitud de oscilación en 7 % y +/-7 % de OD respectivamente) de manera que las células experimentasen períodos alternantes cada vez más prolongados ante condiciones óptimas y limitantes de OD. Dichos cultivos fueron comparados contra cultivos control a 10 % de OD constante.

En el presente estudio se realizó el análisis cromatográfico del patrón de N-glicosilación del AcM producido bajo dichas condiciones. En las condiciones a OD constante, 6400 y 12800 s únicamente se realizó el análisis de un cultivo, para las condiciones a 800 y 1600 s un duplicado de los cultivos también fue analizado. En la Figura 9 se muestran los perfiles cromatográficos (a 25 mM de formato de amonio) de los oligosacáridos presentes en los AcM de las cinco condiciones. Un total de 31 picos fueron resueltos de los cuales entre 24 y 26 conformaron cada condición. Como paso preliminar para la identificación de las estructuras correspondientes a cada pico, los tiempos de retención se transformaron a unidades de glucosa.

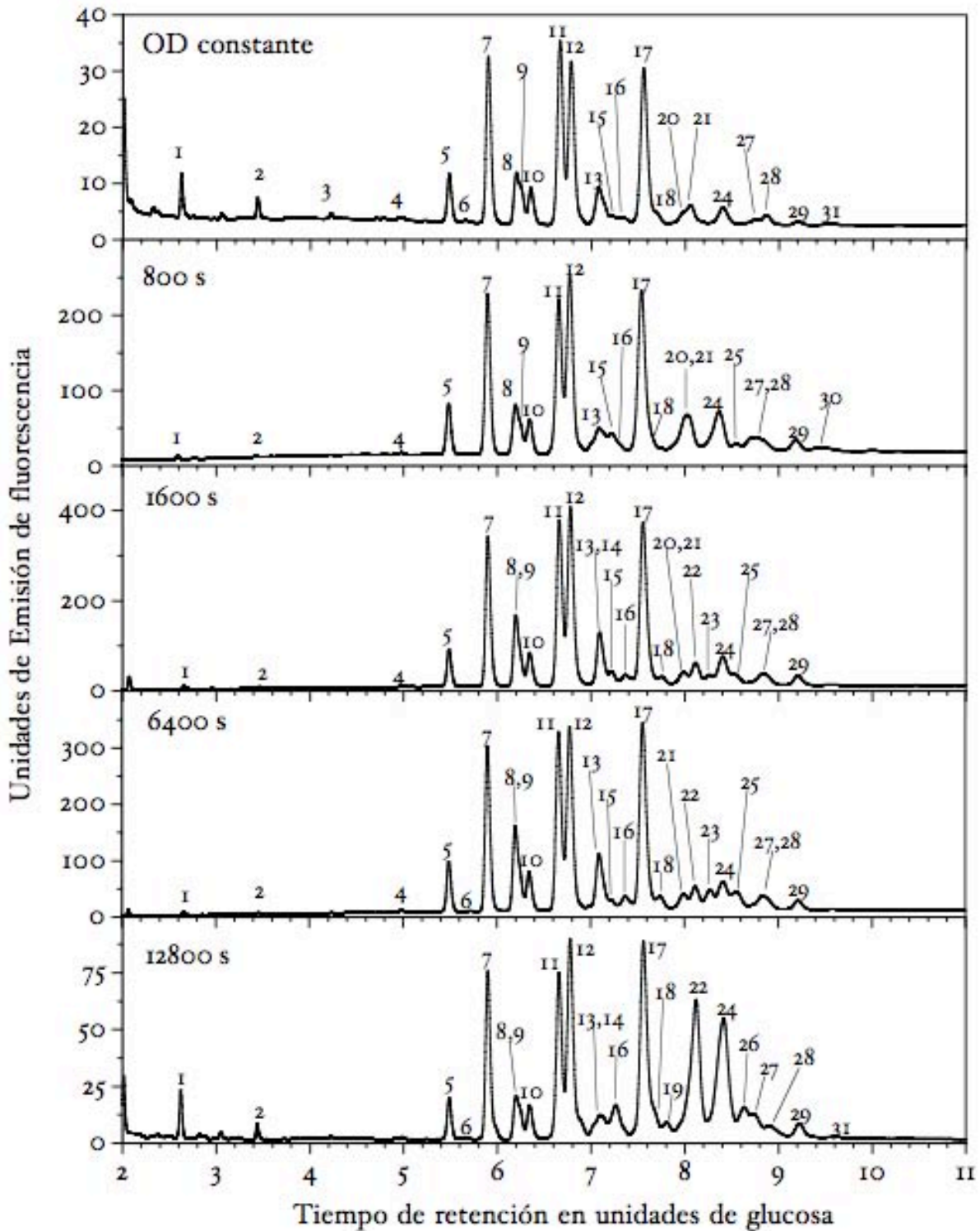


Figura 9. Perfiles cromatográficos a 25 mM de formato de amonio de los glicanos presentes en los AcM de las cinco condiciones evaluadas. Los números sobre los picos representan la estructura correspondiente de acuerdo a la Tabla I.

En la **Tabla 2** se enumeran las estructuras propuestas para cada pico basándose en tablas de estructuras reportadas en la literatura a las mismas UG utilizando el mismo método de análisis (Guile *et al.*, 1996, 1997; Takahashi y Tomiya, 1992) y confirmadas mediante patrones de digestión con exoglicosidasas específicas como se ejemplifica en la **Figura 10**, los cuales permiten identificar los monosacáridos terminales de cada una de la o las estructuras presentes en cada pico. Además se realizaron análisis cromatográficos a 250 mM de formato de amonio los cuales permiten una mejor separación de los oligosacáridos con carga negativa (sializados) de los oligosacáridos neutros (todos los demás) como se ejemplifica en la **Figura 11** (véase la descripción detallada de la nomenclatura y los procedimientos anteriores en la sección de Materiales y Métodos). Mediante el análisis de los resultados obtenidos por los tres procedimientos anteriores un total de 40 estructuras diferentes fueron propuestas para los 31 picos identificados, de las cuales 17 estructuras co-migraron. Si bien la capacidad de resolución de una mezcla de oligosacáridos mediante el método cromatográfico es excelente, la presencia de dos o más estructuras en el mismo pico ocurre debido a que tales oligosacáridos tienen igual hidrofiliidad aún siendo estructuralmente diferentes por lo que se separan de la fase estacionaria al mismo tiempo y no es posible resolverlos. En la **Tabla 2** se muestra también el porcentaje relativo de cada estructura con respecto al total de oligosacáridos presentes en el AcM. Las estructuras que co-migran se muestran en filas independientes con el mismo número de pico. En el caso de los picos 10, 11, 27 y 29, dos estructuras probables se identificaron para cada pico y no pudieron ser diferenciadas por el análisis de exoglicosidasas, por tanto se enumeraron en la misma fila.

Tabla 2. Estructuras propuestas de glicanos presentes en el AcM producido bajo diferentes periodos de oscilación de OD.

Pico	UG	Estructura propuesta	% de estructuras de glicanos a los diferentes periodos de oscilación				
			0	800*	1,600*	6,400	12,800
1	2.63	N2M	3.6	3.1±2.8	0.4±0.1	0.3	2.6
2	3.44	N2FM2	1.7	1.6±1.5	0.1±0.0	0.1	0.7
3	4.22	N2M3	0.4	0.4±0.4	0.0	0.0	0.0
4	4.98	N2FM3	0.5	0.5±0.3	0.2±0.1	0.2	0.0
5	5.48	A2Go	4.4	4.0±0.3	3.4±0.0	4.0	2.4
6	5.66	A2BGo	0.2	0.2±0.2	0.1±0.0	0.1	0.1
7	5.90	A2FGo	15.8	12.7±1.3	14.0±0.3	13.3	10.4
8	6.20	M5	3.5	3.1±1.1	3.6±2.2	5.5	2.0
9	6.24	A2G1(1,6)	3.7	2.6±0.8	3.5±1.5	3.0	1.7
10	6.35	A2G1(1,3) o A2BG1(1,6)	3.6	3.1±0.2	2.9±0.3	3.4	2.2
11	6.66	A2FG1(1,3) o A2FBG1(1,6)	17.3	14.7±1.5	14.2±0.9	14.4	10.2
12	6.78	A2FBG1(1,3)	16.0	16.3±0.4	16.9±0.6	15.8	12.9
13	7.08	A2G2S1	2.5	1.3±0.5	2.9±0.7	1.4	1.6
13	7.08	M6	2.1	1.4±0.7	1.1±1.1	4.4	0.0
14	7.10	A2G2	0.0	1.4±1.4	0.9±0.9	0.0	1.3
15	7.21	A2BG2	0.6	1.0±1.0	1.5±0.2	1.0	0.0
16	7.30	A2G2S1	0.6	0.8±0.1	0.9±0.5	1.7	1.2
16	7.30	A2FG2	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2
17	7.56	A2FBG2	15.6	14.7±0.2	16.1±0.5	16.3	13.7
17	7.56	A2FG2S1	0.0	0.0	0.9±0.9	0.0	0.0
18	7.68	A2BG2S1	0.7	4.2±2.3	0.5±0.5	1.4	1.4
19	7.81	A2G2S2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
20	7.99	M7	0.8	1.6±0.2	1.1±0.4	0.0	0.0
21	8.06	A2FBG2S2	2.2	3.2±1.9	2.9±2.9	1.7	0.0
22	8.12	M6	0.0	0.0	0.6±0.6	0.0	5.1
22	8.12	A2FBG2S2	0.0	0.0	0.6±0.6	2.2	7.7
23	8.27	A2FG2S2	0.0	0.0	0.5±0.5	1.9	0.0
24	8.40	A2FBG2S2	1.3	2.5±0.7	2.4±0.1	0.0	7.5
24	8.40	M8	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0
24	8.40	A3G3	0.7	1.5±1.0	2.4±1.2	1.1	4.9
25	8.56	M8	0.0	0.0	0.6±0.6	0.0	0.0
25	8.56	A3G3S1	0.0	0.5±0.5	0.3±0.3	2.0	0.0
26	8.64	A3FG3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
26	8.64	A3G3S3	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3
27	8.74	A3FG3S2, A3BG3S2	0.5	1.3±0.8	1.2±1.2	0.0	1.8
27	8.74	M7 o M8	0.0	0.7±0.7	0.6±0.6	1.7	0.0
28	8.87	A3G3S2	0.9	0.2±0.2	1.0±1.0	0.5	1.3
29	9.20	A3G3FBS1, A3G3S2	0.3	1.0±0.5	1.2±0.2	0.9	1.2
30	9.43	M9	0.0	0.5±0.5	0.5±0.5	0.0	0.0
31	9.57	A3G3FBS3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2

* Muestran el valor promedio y la diferencia entre dos cultivos.

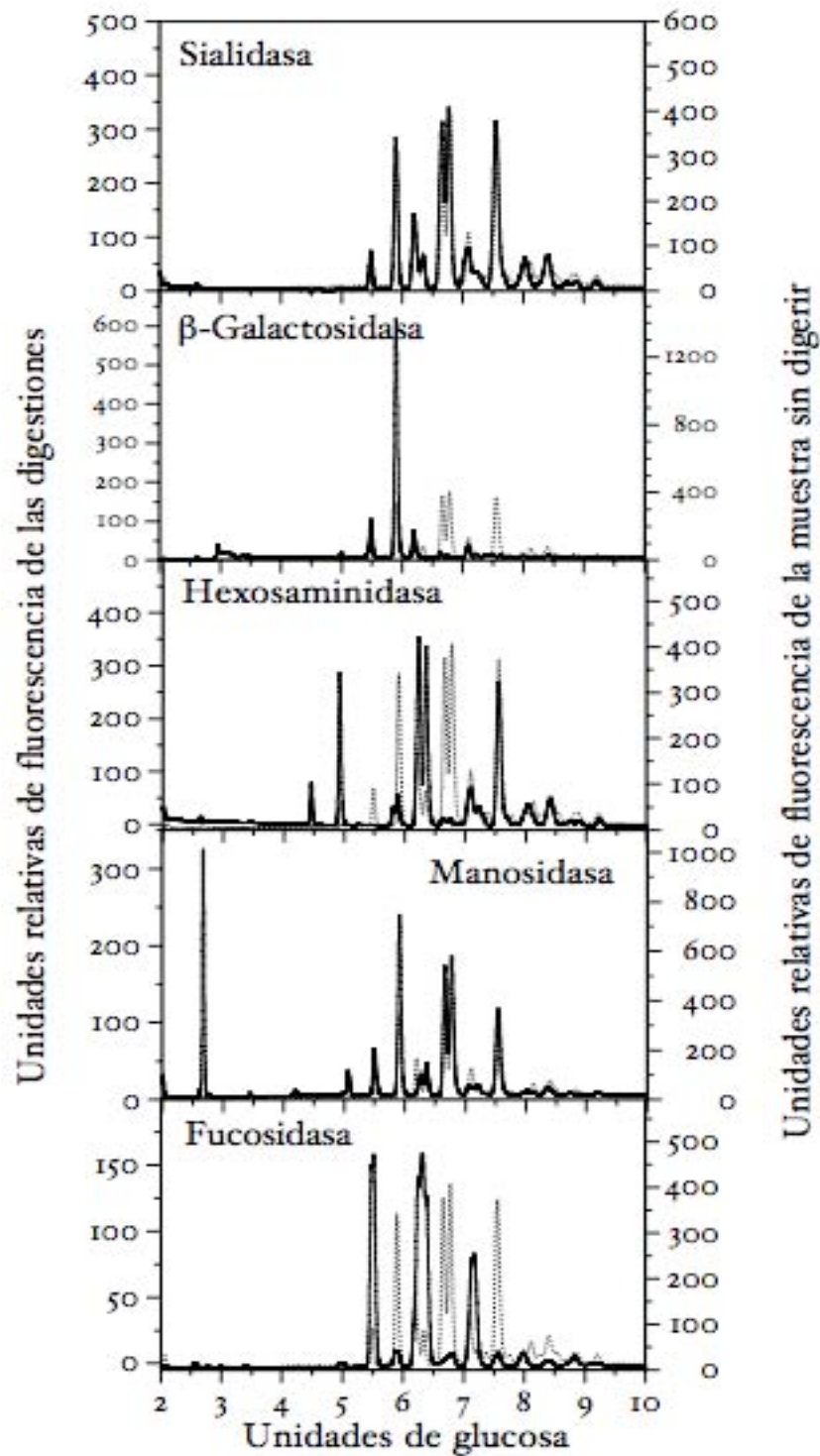


Figura 10. Digestiones con exoglicosidasas específicas de una muestra a OD oscilante con periodo de oscilación de 1600s. La línea punteada corresponde a la muestra sin digerir y la línea continua corresponde a la muestra digerida.

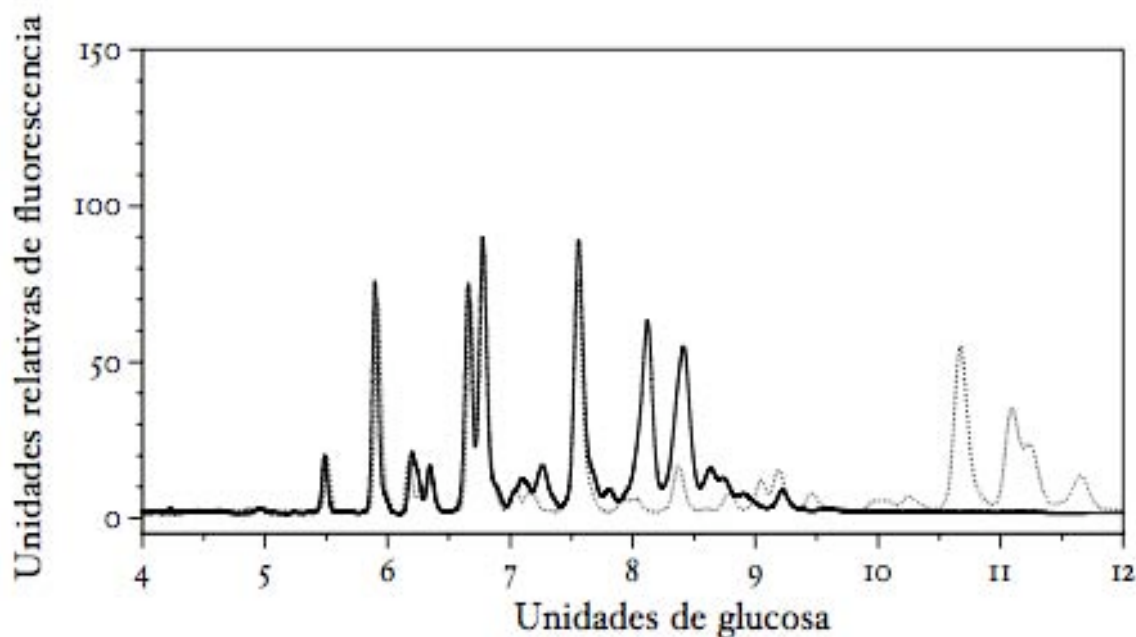


Figura 11. Comparación entre los análisis cromatográficos de glicanos a 25 mM (línea continua) y 250 mM (línea punteada) de formato de amonio como fase móvil.

En la **Figura 12** se esquematiza la representación gráfica para cada una de las 40 estructuras identificadas, agrupadas en los tres principales grupos de oligosacáridos; tipo paucimanosa por poseer tres o menos monosacáridos de manosa (M) después de los dos monosacáridos iniciales de N-acetilglucosamina (GlcNAc), tipo complejo por poseer una estructura de oligosacárido más procesada donde además del pentasacárido común GlcNAc₂ M₃, hay GlcNAc, galactosa (G) o ácido siálico (S) terminal y finalmente el tipo de oligosacáridos de alta manosa como su nombre lo dice por tener únicamente M después del pentasacárido común. Se puede ver que los picos 9, 10; 11, 12; 13, 16; 21, 22, 24; 28, 29; 20, 22, 24 y 25, 27 tienen estructuras similares que corresponden a isómeros posicionales (estructuras con el mismo número y tipo de monosacáridos que por el hecho de tener el o los monosacáridos terminales en antenas -o ramas- diferentes eluyen a diferentes UG). Con la finalidad de determinar el efecto de los

diferentes gradientes de OD sobre la glicosilación de los AcM, se comparó el porcentaje relativo de cada uno de los diferentes grupos de oligosacáridos arriba mencionados, a las diferentes condiciones analizadas. En el caso de los oligosacáridos de tipo complejos, éstos se agruparon a su vez en oligosacáridos de tipo G₀ (oligosacáridos con GlcNac terminal, es decir, sin galactosas terminales), de tipo G₁, G₂ y G₃ a los oligosacáridos con una, dos y tres galactosas terminales respectivamente y oligosacáridos sialidados a todos los oligosacáridos con S terminales sin importar el número. En la **Tabla 3** se muestra el porcentaje relativo de cada uno de los diferentes grupos de oligosacáridos, a las diferentes condiciones analizadas. Se determinó que en todas las condiciones evaluadas, los oligosacáridos de tipo complejo (sialidados+galactosilados) representaron aproximadamente el 70 % del total de los oligosacáridos presentes, siendo los de tipo G₁ los que se encontraron en mayor proporción. En el caso de los oligosacáridos de tipo pausimansa, los cuales son un indicador de una actividad degradativa, se observó una tendencia a disminuir a medida que aumentó el periodo de oscilación de los gradientes de OD, excepto para la condición más extrema a 12800 s, donde el porcentaje se incrementó nuevamente aunque a la mitad del porcentaje determinado para los cultivos control. Con respecto al porcentaje de estructuras de alta manosa, las cuales son un indicativo de un procesamiento incompleto del oligosacárido en el RE y AG, se observó una tendencia a aumentar a medida que se incrementaron los periodos de oscilación, excepto en la condición a 12800 s, la cual disminuyó al mismo nivel que en la condición a OD constante.

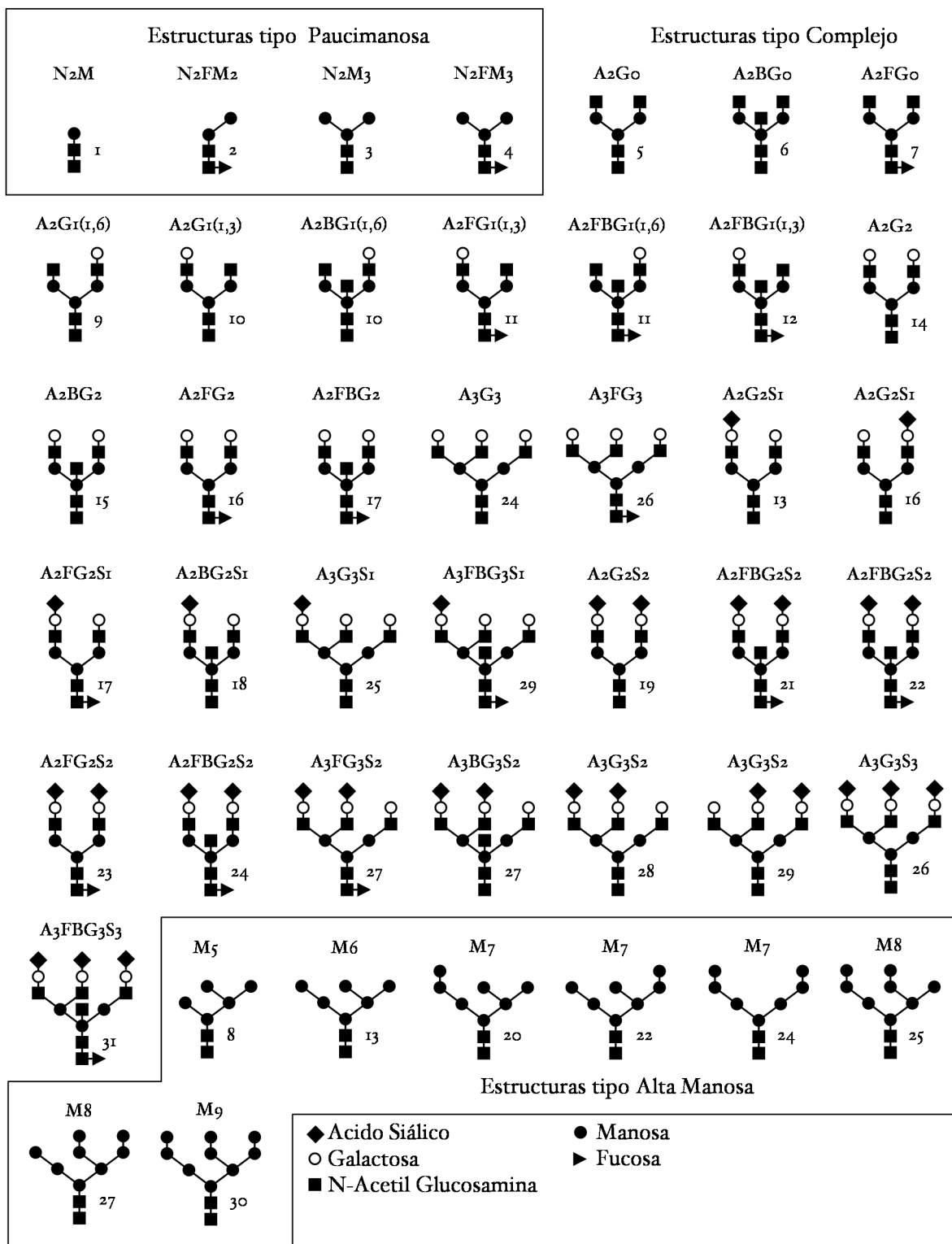


Figura 12. Representación gráfica de las estructuras propuestas para los oligosacáridos presentes en el AcM BCF₂. El número a la derecha de cada estructura indica el número de pico, como se describe en la Tabla 1.

Tabla 3. Porcentaje relativo de los grupos característicos de oligosacáridos presentes en el AcM producidos bajo diferentes periodos de oscilación de OD.

Tipo de Glicano	OD cte	800* s	1600* s	6400 s	12800 s
Paucimanosa	6.2	5.6 ± 5.0	0.7 ± 0.1	0.6	3.4
Altos en manosa	6.5	7.3 ± 2.8	8.2 ± 3.8	13.5	7.2
Go	20.4	16.9 ± 1.3	17.4 ± 0.3	17.4	12.9
G1	40.8	36.7 ± 2.1	37.5 ± 0.3	36.5	27.0
G2	16.2	17.1 ± 0.2	18.6 ± 0.6	17.2	17.2
G3	0.7	1.5 ± 0.1	2.4 ± 1.8	1.1	5.2
Sialidados	9.2	15.0 ± 2.3	15.2 ± 1.9	13.6	27.4

* Muestran el valor promedio y la diferencia entre dos cultivos.

En la **Figura 13** se muestra el efecto de los gradientes de OD a los diferentes periodos de oscilación sobre los grupos de oligosacáridos que sufrieron mayor cambio. Se determinó un incremento en el porcentaje relativo de las estructuras con S terminales así como triantenarias galactosiladas, mientras que las estructuras Go y G1 disminuyeron, ésto conforme los períodos de oscilación aumentaron. Se determinó que los gradientes de oxígeno disuelto con un periodo de oscilación de 12800 s disminuyeron el porcentaje de las estructuras de tipo Go y G1 en un 14 % mientras que las estructuras de tipo G3 y con S se incrementaron un 23 %.

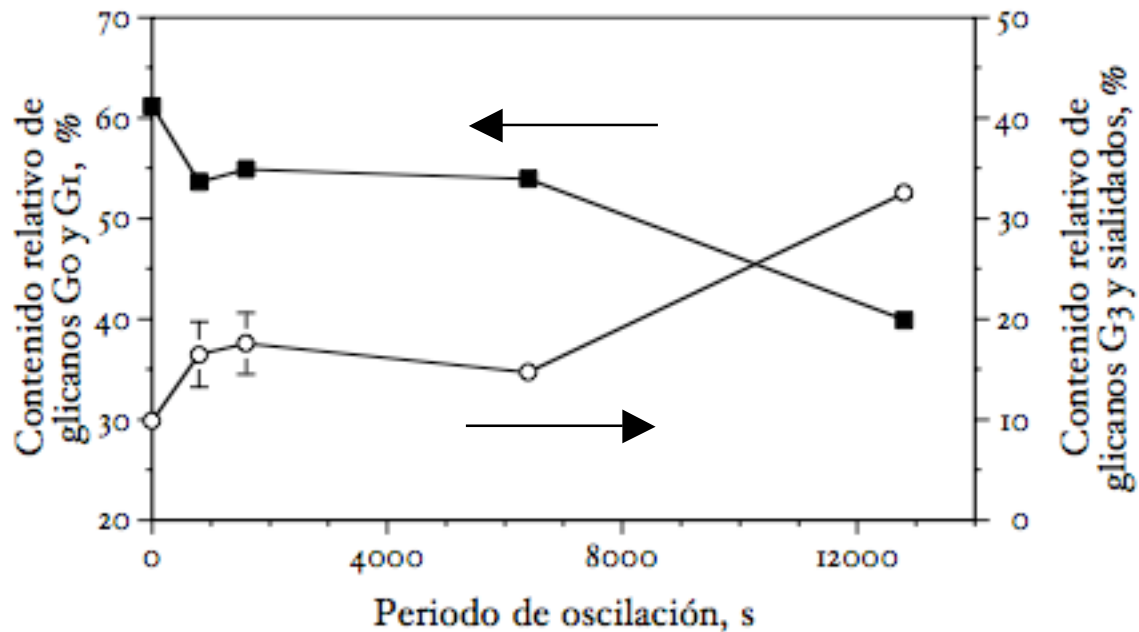


Figura 13. Efecto de los gradientes de OD a los diferentes periodos de oscilación sobre los grupos de oligosacáridos que sufrieron mayor cambio.

Los resultados de **Serrato (2002)** muestran que los cultivos de hibridomas sometidos a condiciones oscilatorias de OD tuvieron repercusiones significativas en algunos de los parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo a medida que aumentaron los periodos de oscilación. Sin embargo no mostraron un efecto significativo sobre el proceso de producción de AcM cuando fueron comparados con los cultivos control a OD constante. Una conclusión de acuerdo con tales resultados sería que los cultivos de hibridomas pueden llevarse a cabo sin un estricto control del OD. No se esperaría un efecto negativo en el desempeño general del cultivo o la producción de AcM si se implementaran estrategias de aireación intermitente con periodos bajo condiciones limitantes de oxígeno incluso de horas. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de este estudio se determinó que aún cuando no se observaron efectos significativos en las variables macroscópicas de cultivo evaluadas, sí ocurrieron cambios importantes a nivel macromolecular en las características estructurales del AcM que determinan su actividad biológica. El patrón de glicosilación que

se determinó en el AcM producido en cultivo a 10 % de OD fue el patrón típico reportado para IgG (Guile *et al.*, 1996; Saba *et al.*, 2002). En el caso de los cultivos ante condiciones oscilatorias a medida que se incrementó el periodo de oscilación, el porcentaje de estructuras atípicas triantenarias y sialidadas se incrementó (véase Tabla 3). Es evidente que, haber sometido a los hibridomas a largos periodos alternantes de anoxia, hipoxia y OD no limitante, resultó en cambios importantes en la glicosilación de los AcM. Existe escasa evidencia en la literatura del efecto del OD en la glicosilación de proteínas y únicamente un estudio con AcM. Kunkel *et al.* (1998) observaron una disminución en la galactosilación de AcM producidos a 10 % de OD, sin un efecto significativo en la producción máxima del AcM, en comparación con cultivos a 50 % de OD. Dichos autores atribuyeron tales efectos a alteraciones en las actividades enzimáticas de las vías del metabolismo central y a la falta de nucleótido-azúcares, precursores de la síntesis de oligosacáridos ante limitaciones de oxígeno. Debido a que en el presente estudio se observó un incremento en el nivel de procesamiento de oligosacáridos evidenciado por el aumento de estructuras G₃ y sialidadas, es posible que los fenómenos descritos por Kunkel *et al.* (1998) responsables de la disminución en la galactosilación de AcM no ocurren cuando se experimentó un perfil oscilatorio de OD. Además, a nuestro conocimiento, los efectos en la glicosilación de AcM a niveles de OD por debajo del 10 % no han sido estudiados. Una posible explicación para el incremento en las estructuras G₃ y sialidadas obtenidos a altos periodos de oscilación de OD tiene que ver con alteraciones ocasionadas a la estructura del AcM. Los AcM de clase G poseen 16 puentes disulfuro que son cruciales para su correcta conformación (Goding, 1986). Se sabe que uno de los principales efectos ante condiciones de cultivo adversas es un ineficiente plegamiento de las proteínas (Palomares *et al.*, 2004). Además, está documentado el hecho

de que condiciones de cultivo anóxicas ocasionan cambios en el potencial redox intracelular (Hevehan y Miller, 1999). Normalmente, el oligosacárido se encuentra inmóvil entre los dos dominios CH₂ del AcM en estrecha interacción con los aminoácidos de su entorno (Lund *et al.*, 1996), por lo que es inaccesible a la acción de las enzimas sialiltransferasas (Jassal *et al.*, 2001). Así, es posible que el incremento observado en el porcentaje de estructuras G₃ y sialidades, a medida que se incrementó el periodo de oscilación de OD, se debió a un plegamiento ineficiente del AcM que permitió el acceso de las enzimas glicosiltransferasas. En soporte de esta hipótesis Jassal *et al.* (2001) mencionan que la sialidación del AcM está controlada en primera instancia por la estructura de la proteína donde se localiza el oligosacárido. Además, Mattu *et al.* (1998) determinaron que los oligosacáridos de las IgA₁ son ampliamente glicosilados y sialilados en comparación con las IgG debido muy probablemente a que los oligosacáridos de las IgA no se encuentran confinados a un espacio interno restringido como en el caso de las IgG. El hecho de que el incremento en el porcentaje de las estructuras tipo G₃ y sialidades fuese a expensas de las estructuras tipo G₀ y G₁ puede explicarse por el hecho de que en las IgG las estructuras agalactosiladas son más móviles que las galactosiladas (Ghirlando *et al.*, 1999), lo que puede contribuir a la disponibilidad del oligosacárido hacia las enzimas glicosiltransferasas.

10.2 EFECTO DEL pH Y dCO_2 CONSTANTES Y OSCILANTES SOBRE EL CRECIMIENTO, METABOLISMO Y GLICOSILACIÓN DEL ACM PRODUCIDO POR CULTIVO *IN VITRO* DEL HIBRIDOMA BCF₂

Se realizaron cultivos control por duplicado a 12, 50, 170 y 250 mbar de dCO_2 constante, manteniendo el pH constante en 7.2 y el OD en 50 % en todos los cultivos. En la [Figura 14A](#) se muestran los controles representativos de un cultivo a 170 mbar de dCO_2 y pH de 7.2. En la [Figura 14B](#) se muestra el perfil de OD a 50 % así como el porcentaje de los flujos de gases de O_2 , N_2 y CO_2 a lo largo del cultivo para poder mantener el dCO_2 y OD en los valores predeterminados.

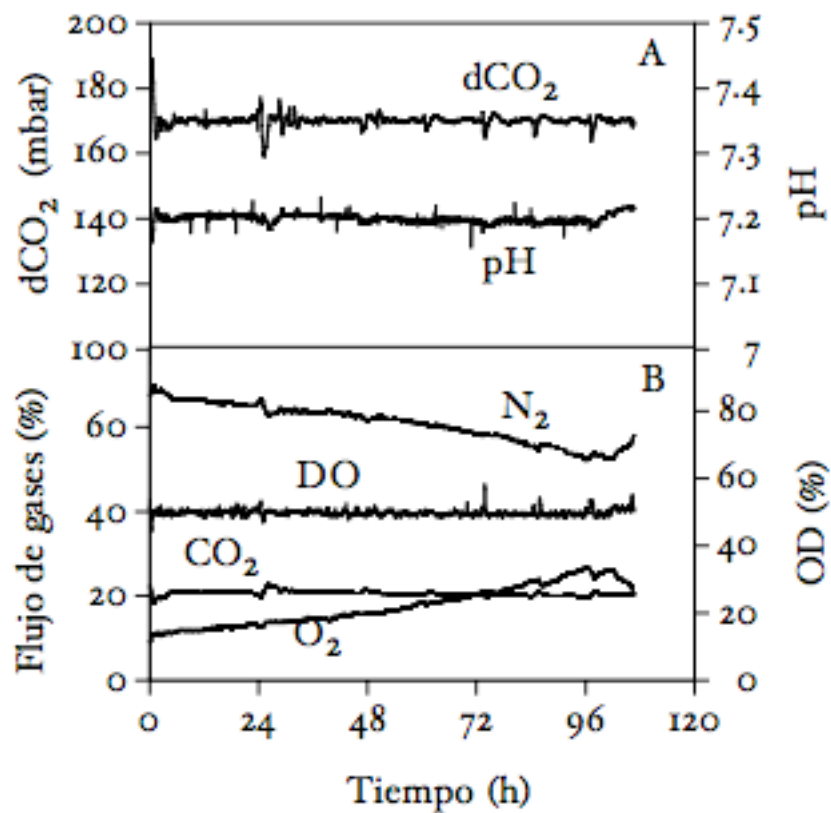


Figura 14. Cultivo representativo a pH y dCO_2 constantes, en pH 7.2 y 170 mbar, respectivamente.

Perfiles similares se obtuvieron para los cultivos a 12, 50 y 250 mbar de dCO_2 constante.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de los cultivos de hibridomas ante condiciones heterogéneas de pH y $d\text{CO}_2$ (situación real de un cultivo de células animales a gran escala o de alta densidad celular), se realizaron cultivos por duplicado a $d\text{CO}_2$ y pH oscilante, manteniendo el OD constante en 50 %. Tres periodos de oscilación fueron evaluados, 1800, 3600 y 7200 s, cada condición con diferentes ejes y amplitudes de oscilación (véase Fig. 15).

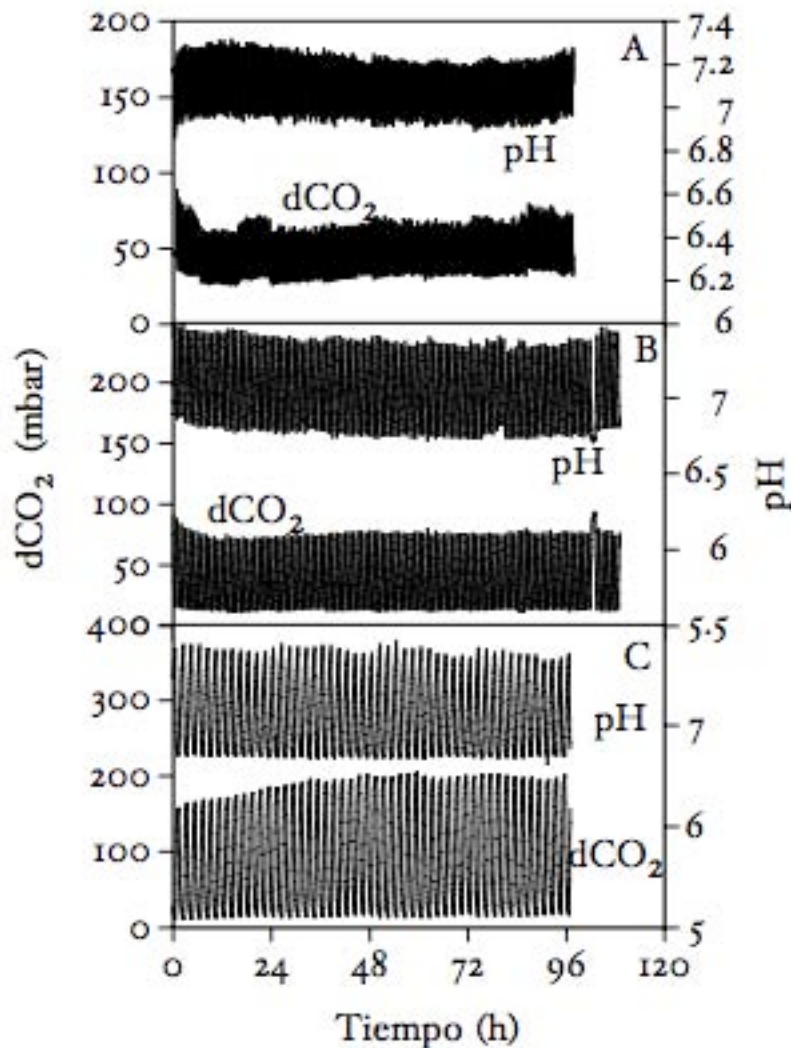


Figura 15. Cultivos a pH y $d\text{CO}_2$ oscilantes. (A) Periodo de oscilación de 1800 s, (B) periodo de oscilación de 3600 s y (C) periodo de oscilación de 7200 s.

En la **Figura 15A** se observan los controles de dCO_2 y pH oscilante, de un cultivo con periodo de oscilación de 1800 s. Ante tal condición la amplitud de la oscilación de pH fue de ± 0.2 unidades con un eje de oscilación de 7.1 unidades y la amplitud de oscilación de dCO_2 fue de ± 20 mbar con un eje de oscilación de 50 mbar. En **Figura 15B** se muestran los perfiles de dCO_2 y pH oscilante de un cultivo con un periodo de oscilación de 3600 s. Ante tal condición la amplitud de oscilación de pH fue de ± 0.3 unidades con un eje de oscilación de 7.1 unidades y la amplitud de oscilación de dCO_2 fue de ± 30 mbar con un eje de oscilación de 45 mbar. En la **Figura 15C** se muestran los perfiles de pH y dCO_2 oscilante para un cultivo con un periodo de oscilación de 7200 s. Ante tal condición la amplitud de oscilación de pH fue de ± 0.5 unidades con un eje de oscilación de 7.3 unidades y la amplitud de oscilación de dCO_2 fue de ± 90 mbar con un eje de oscilación de 100 mbar. Como se aprecia en la **Figuras 16A, 16B y 16C** así como en la **Tabla 4**, las concentraciones celulares viable y total máximas en los cultivos a dCO_2 y pH constante alcanzaron su valor máximo en los cultivos realizados a 50 mbar y disminuyeron progresivamente por encima y también por debajo de dicha condición sugiriendo a la concentración de dCO_2 fisiológica como la condición óptima para crecimiento celular. Las curvas de crecimiento para los cultivos a 12 y 50 mbar tuvieron un comportamiento cinético similar durante la mayor parte del cultivo sin embargo, los cultivos a 50 mbar alcanzaron una mayor concentración celular debido a que su etapa de crecimiento exponencial fue más prolongada que para los cultivos a 12 mbar. Se puede ver que los hibridomas cultivados a 170 mbar y 250 mbar tuvieron un efecto negativo importante en las cinéticas de crecimiento. Lo anterior se ve claramente reflejado en las velocidades específicas máximas de crecimiento alcanzadas, siendo la más alta e igual para los cultivos a 12 y 50 mbar, un 25 % menor para los cultivos a 170 mbar y un 63 % menor para los hibridomas cultivados a 250 mbar, **ver Tabla 4**.

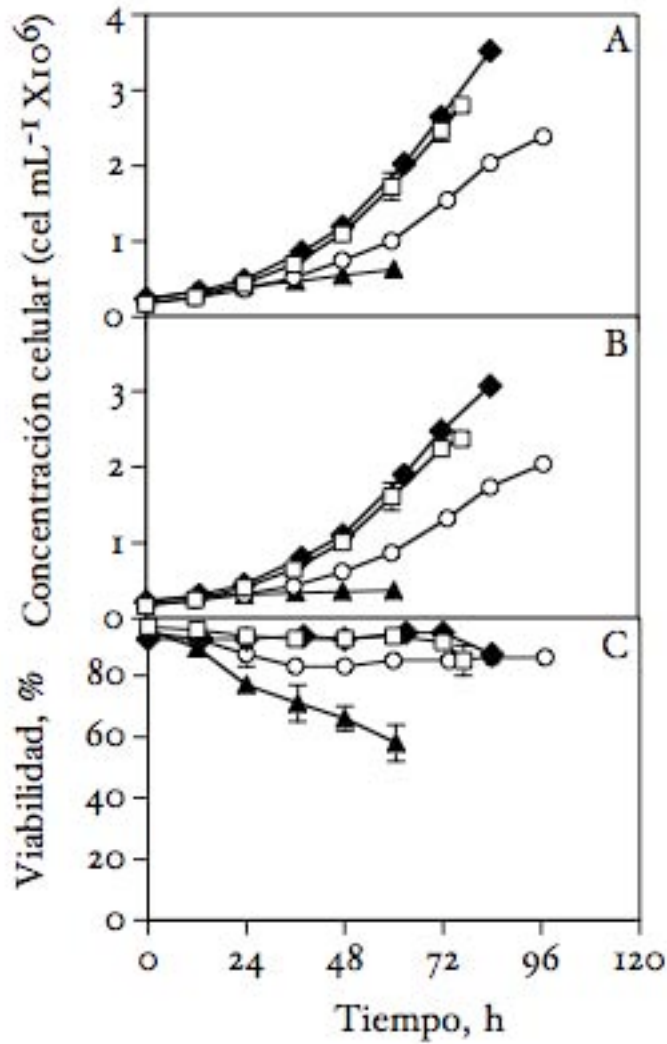


Figura 16. Concentración celular y viabilidad de los cultivos a pH y dCO_2 constantes. dCO_2 de 12 mbar (cuadros), dCO_2 de 50 mbar (rombos), dCO_2 de 170 mbar (círculos) y dCO_2 de 250 mbar (triángulos).

En el caso de los cultivos a 250 mbar el efecto fue tan marcado que además de la baja velocidad específica de de crecimiento alcanzada, los cultivos no mantuvieron la viabilidad por arriba del 90 % después de las 12 horas de cultivo, disminuyendo progresivamente hasta el 60 % a las 60.5 h, tiempo en el que se concluyeron las cinéticas.

Tabla 4. Principales parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos a dCO₂ y pH constante y oscilante. Los números entre paréntesis indican la diferencia del promedio entre dos cultivos.

Coeficiente	Condición						
	dCO ₂ constante				dCO ₂ oscilante		
	12 mbar	50 mbar	170 mbar	250 mbar	1800 s	3600 s	7200 s
Tiempo de cultivo (h)	77	84	97	60.5	97.5	96	96
X _{t max} × 10 ⁶ (cel mL ⁻¹)	2.80 (0.13)	3.52 (0.01)	2.39 (0.01)	0.63 (0.10)	3.77 (0.15)	3.05 (0.01)	2.06 (0.24)
X _{t init} × 10 ⁶ (cel mL ⁻¹)	0.17 (0.01)	0.22 (0.01)	0.19 (0.01)	0.24 (0.01)	0.22 (0.00)	0.18 (0.00)	0.23 (0.00)
X _{v max} × 10 ⁶ (cel mL ⁻¹)	2.37 (0.04)	3.07 (0.07)	2.04 (0.01)	0.37 (0.10)	3.15 (0.18)	2.61 (0.08)	1.39 (0.24)
Viabilidad _{init}	96 (1)	92 (2)	94 (1)	95 (0)	95 (0)	96 (0)	96 (0)
Viabilidad _{final}	85 (5)	87 (3)	86 (0)	58 (6)	84 (1)	86 (3)	74 (3)
AcM _{max} (mg L ⁻¹)	109.5 (0.6)	87.5 (3.9)	102.6 (6.6)	20.0 (1.1)	136.9 (6.5)	121.8 (1.8)	86.4 (4.5)
Glc _{init} (mM)	20.3 (0.3)	17.8 (0.6)	19.2 (0.2)	18.6 (0.7)	18.6 (0.8)	18.4 (0.1)	20.6 (0.8)
Glc _{final} (mM)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.2 (0.2)	15.2 (0.8)	0.3 (0.1)	2.3 (0.4)	14.0 (1.0)
Lac _{max} (mM)	26.4 (1.4)	19.7 (1.1)	20.6 (1.2)	4.9 (0.3)	18.6 (0.8)	18.6 (0.8)	12.1 (0.2)
Gln _{init} (mM)	6.5 (0.1)	6.2 (0.0)	5.8 (0.4)	5.2 (0.1)	6.3 (0.1)	6.2 (0.1)	5.7 (0.1)
Gln _{final} (mM)	1.1 (0.3)	0.3 (0.1)	0.1 (0.1)	3.0 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.7 (0.7)
μ (h ⁻¹)	0.039 (0.002)	0.040 (0.001)	0.030 (0.001)	0.015 (0.001)	0.032 (0.002)	0.031 (0.001)	0.025 (0.004)
Y _{Lac/Glc} (mol mol ⁻¹)	1.2	1.2	1.0	0.7	1.0	1.0	1.4
Y _{cel/Glc} (cel nmol ⁻¹)	98	149	108	37	204	179	278
Y _{cel/Gln} (cel nmol ⁻¹)	455	556	357	73	500	370	476
Y _{Lac/cel} (pmol cel ⁻¹)	13.9	8.4	9.3	18.8	4.3	5.4	5.0
Y _{AcM/cel} (pg cel ⁻¹)	40.5	25.8	44.0	61.3	29.9	53.8	35.9
q ^{Glc} (pmol h ⁻¹ cel ⁻¹)	.40	.27	.28	.41	.16	.17	.09
q ^{Gln} (pmol h ⁻¹ cel ⁻¹)	0.086	0.072	0.084	0.206	0.064	0.084	0.053
q ^{Lac} (pmol h ⁻¹ cel ⁻¹)	0.54	0.34	0.28	0.28	0.14	0.17	0.13
q ^{AcM} (pg h ⁻¹ cel ⁻¹)	1.58	1.03	1.32	0.92	0.96	1.67	0.90
P (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	1.42	1.04	1.05	0.33	1.40	1.26	0.90

Con respecto a la viabilidad en las demás condiciones, los cultivos a 12 y 50 mbar mantuvieron la viabilidad por encima del 90 % durante todo el cultivo excepto en el punto final. En los cultivos a 170 mbar la viabilidad disminuyó progresivamente durante las primeras 36 h para luego mantenerse constante en 86 % hasta el final del cultivo. En la **Figura 17** se muestran los perfiles cinéticos de consumo y producción de metabolitos.

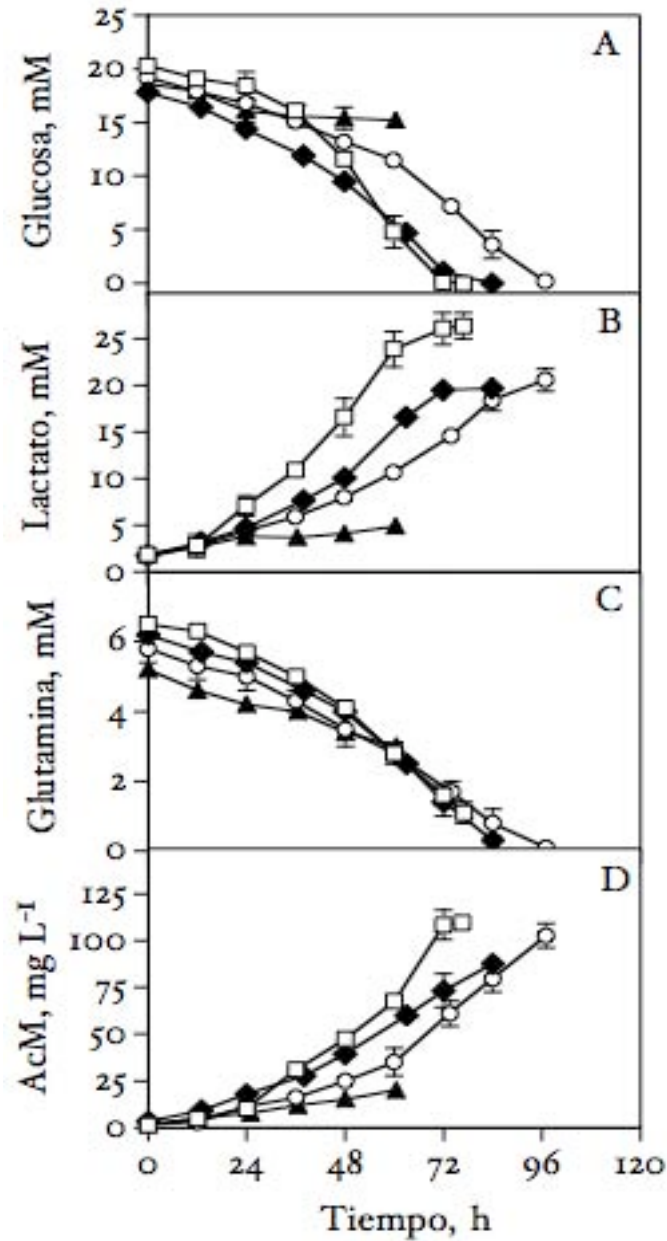


Figura 17. Consumo y/o producción de metabolitos de los cultivos a pH y dCO_2 constantes. dCO_2 de 12 mbar (cuadros), dCO_2 de 50 mbar (rombos), dCO_2 de 170 mbar (círculos) y dCO_2 de 250 mbar (triángulos).

En los cultivos de hibridomas a 12 mbar no se observó agotamiento de glutamina, en tanto que la glucosa (Figuras 17A y 17C) se depletó incluso antes de finalizar el cultivo. La velocidad de consumo de glucosa fue al igual que para los cultivos a 250 mbar la más alta alcanzada. Por su parte en los cultivos a 50 mbar la glucosa y la glutamina se agotaron al mismo tiempo (84 h); el mismo comportamiento ocurrió para los cultivos a 170 mbar aunque en esta condición a las 96 h de cultivo. En ambos casos, dicho comportamiento coincidió con el tiempo en que se finalizaron los cultivos. Adicionalmente, dichas condiciones de cultivo tuvieron igual velocidad de consumo de glucosa. Por su parte los cultivos de hibridomas a 12, 50 y 170 mbar de dCO₂ tuvieron igual velocidad de consumo de glutamina (Tabla 4). En el caso de los cultivos a 250 mbar no se observó agotamiento de ninguna de las dos fuentes de carbón y energía, lo cual se explica por la corta duración del cultivo y bajo crecimiento. Sin embargo, como ya se ha mencionado, en esta condición la velocidad de consumo de glucosa fue igual de alta que en los cultivos a 12 mbar y la velocidad de consumo de glutamina fue la más alta alcanzada, siendo 2.5 veces mayor que para las demás condiciones evaluadas. Con respecto al rendimiento de células por glucosa y de células por glutamina, en ambos casos los rendimientos máximos se observaron en los cultivos a 50 mbar, seguidos por los cultivos a 12 y 170 mbar y los rendimientos más bajos se observaron en los cultivos a 250 mbar. Con respecto a la producción de lactato se observó que los cultivos a 12 mbar fueron los que mayor concentración alcanzaron (Figura 17B y Tabla 4). Los cultivos a 50 y 170 mbar alcanzaron el mismo nivel de acumulación de lactato aunque en diferente tiempo siendo éste un 23 % menor que en los cultivos a 12 mbar. Los cultivos a 250 mbar tuvieron la producción de lactato más baja debido de igual manera a la corta duración del cultivo y a su mínimo crecimiento. De igual forma la velocidad específica de producción de lactato fue mayor en los cultivos a 12 mbar, seguido de los cultivos a 50 mbar y la menor e igual en los cultivos a 170 y 250 mbar. Sin embargo el rendimiento de lactato por célula alcanzado fue el más alto en los cultivos a 250 mbar,

seguido de los cultivos a 12 mbar y el mínimo e igual para los cultivos a 50 y 170 mbar. Con respecto al rendimiento de lactato por glucosa se puede ver que los cultivos a 12 y 50 mbar mostraron el más alto e igual rendimiento, seguido de los cultivos a 170 mbar con un rendimiento 17 % menor y el más bajo fue para los cultivos a 250 mbar con un rendimiento 42 % menor al obtenido en los cultivos a 12 mbar. Con respecto a la producción de AcM se observó que los cultivos a 12 y 170 mbar alcanzaron la más alta e igual concentración de AcM (Figura 17D y Tabla 4). Sin embargo, los cultivos a 170 mbar alcanzaron tal concentración con 20 h más de cultivo, es decir, su velocidad de producción de AcM fue menor que en los cultivos a 12 mbar que mostraron la más alta velocidad de producción. Debido a su corto periodo de crecimiento y baja concentración celular alcanzada, los cultivos a 250 mbar tuvieron la más baja velocidad de producción y concentración final de AcM, sin embargo, tuvieron el más alto rendimiento de AcM por célula. Si bien los cultivos a 50 mbar resultaron ser la mejor condición para crecimiento celular, no lo fueron para producción de AcM, ya que tanto la velocidad de producción de AcM, el rendimiento de AcM por célula y la concentración máxima de AcM alcanzada a 50 mbar fueron menores que en los cultivos a 12 y 170 mbar. En términos de la productividad volumétrica, los cultivos realizados a 12 mbar resultaron ser la mejor condición para la producción de AcM.

Con respecto a los cultivos de hibridomas realizados a pH y dCO₂ oscilantes, en las tres condiciones evaluadas los cultivos tuvieron una duración aproximada de 96 h, un tiempo similar al de los cultivos a 170 mbar de dCO₂ y pH constantes. Como se aprecia en la Figura 18A, 18B y 18C así como en la Tabla 4 las más altas concentraciones celulares viable y total se observaron en los cultivos con periodo de oscilación de 1800 s, seguido de los cultivos a 3600 s, no obstante, la velocidad específica máxima de crecimiento fue la misma para ambas condiciones. Por su parte los cultivos a 7200 s mostraron las más bajas concentraciones celulares viable y total, así como la más baja

velocidad específica de crecimiento siendo esta última un 22 % menor con respecto a los cultivos a 1800 y 3600 s.

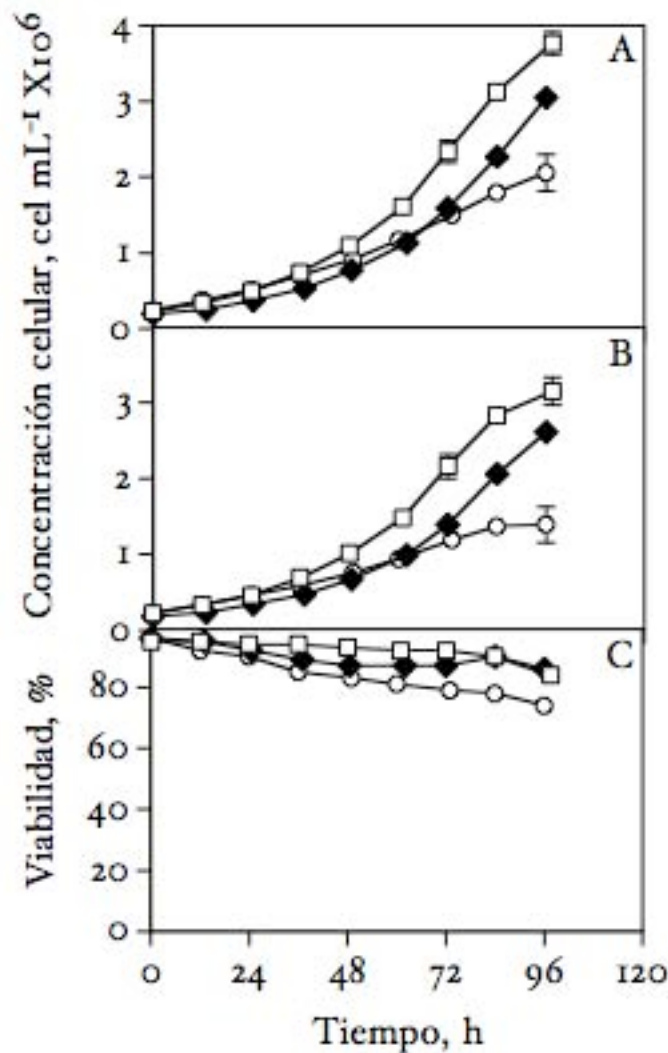


Figura 18. Concentración celular total (A), viable (B) y viabilidad (C) en los cultivos a pH y dCO₂ oscilante. Periodo de oscilación de 1800 s (cuadros), de 3600 s (rombos) y de 7200 s (círculos).

Con respecto a la viabilidad de los cultivos, se observó que en los cultivos a 1800 s la viabilidad se mantuvo por encima del 90 % a lo largo del cultivo excepto en el punto final, terminando en 84 %. En el caso de los cultivos a 7200 s la viabilidad disminuyó progresivamente a lo largo de todo el cultivo, para finalizar en 74 %. En el caso de los cultivos a 3600 s se observó un comportamiento similar al de los cultivos realizados a 170 mbar de dCO₂ y pH constantes, en este caso la viabilidad disminuyó progresivamente

durante las primeras 48 h de cultivo para luego mantenerse constante en 86 % hasta el final del cultivo a las 96 h. En la **Figura 19** se muestran los perfiles cinéticos de consumo y producción de metabolitos.

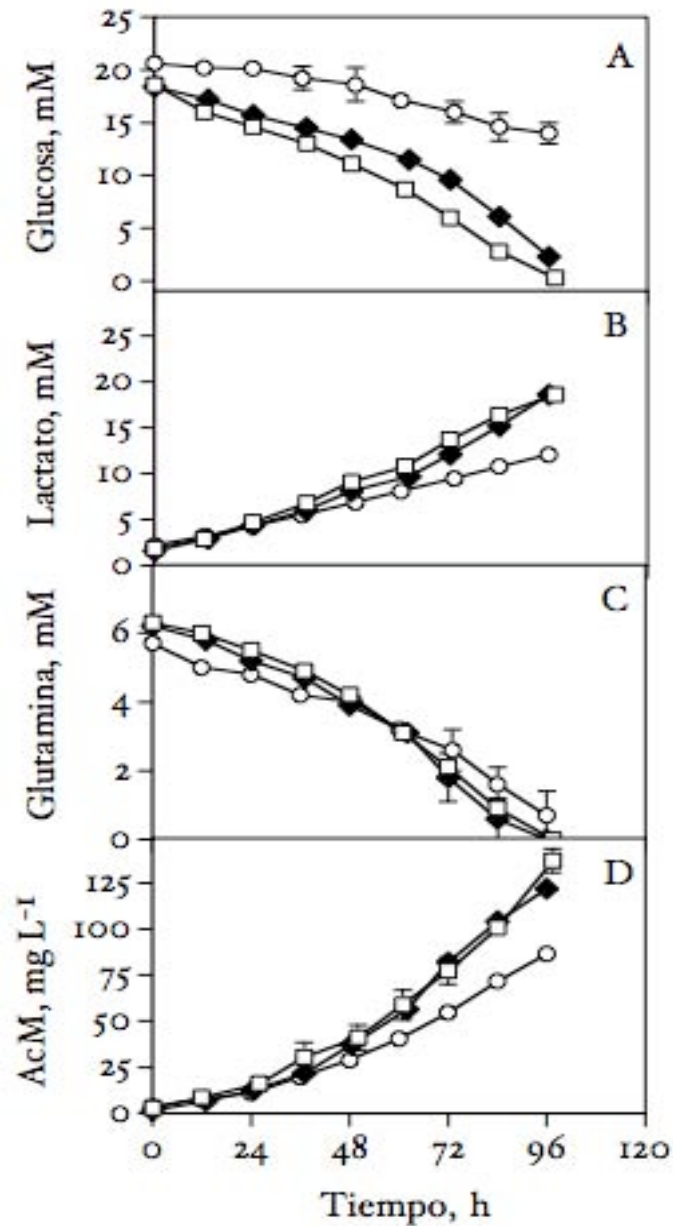


Figura 19. Consumo y/o producción de metabolitos en los cultivos a pH y dCO_2 oscilante. Periodo de oscilación de 1800 s (cuadros), de 3600 s (rombos) y de 7200 s (círculos).

Los cultivos a 1800 s agotaron la glucosa y la glutamina al final del cultivo (**véase Figura 19A y 19C**) mientras que en los cultivos a 3600 s únicamente

hubo agotamiento de glutamina. En el caso de los cultivos a 7200 s no se agotó ninguno de los dos metabolitos. Con respecto a las velocidades de consumo de glucosa y glutamina, fueron los cultivos a 3600 s los que mostraron las más altas velocidades de consumo, seguido de los cultivos a 1800 s los cuales mostraron casi la misma velocidad de consumo de glucosa y una disminución del 24 % en la velocidad de consumo de glutamina. Los cultivos a 7200 s mostraron las velocidades de consumo de glucosa y glutamina más bajas, siendo éstas un 47 % y 37 % menores, respectivamente, a las alcanzadas en los cultivos a 3600 s. Sin embargo, con respecto a los rendimientos de células por glucosa y por glutamina, fueron los cultivos a 3600 s los que mostraron los rendimientos más bajos, siendo el rendimiento de células por glucosa un 36 % menor al máximo alcanzado en los cultivos a 7200 s y el rendimiento de células por glutamina fue 26 % menor con respecto al máximo alcanzado en los cultivos a 1800 s. Con respecto a la producción de lactato se observó que los cultivos a 1800 s y 3600 s alcanzaron la mayor e igual concentración de lactato al final del cultivo (Figura 19B y Tabla 4) y los cultivos a 7200 s la concentración más baja. Con respecto a la velocidad de producción de lactato los cultivos a 3600 s tuvieron la mayor velocidad y los cultivos a 1800 s y 7200 s una disminución de la misma en un 18 y 24 % respectivamente. Con respecto al rendimiento de lactato por célula se observó que el máximo rendimiento lo tuvieron los cultivos a 3600 s, seguidos por los cultivos a 7200 s con una disminución del 10 % y finalmente los cultivos a 1800 s con una disminución del 20 % en el rendimiento. Con respecto al rendimiento de lactato por glucosa se observó que los cultivos a 1800 y 3600 s tuvieron el menor e igual rendimiento y los cultivos a 7200 s el mayor rendimiento, siendo un 40 % mayor a las otras dos condiciones. Con respecto a la producción de AcM se observó que los cultivos a 1800 s alcanzaron la concentración más alta de AcM, seguidos por los cultivos a 3600 s y fueron los cultivos a 7200 s los que alcanzaron la concentración de AcM más baja siendo un 37 % menor con respecto a la máxima alcanzada (Figura 19D). Sin embargo fueron los cultivos a 3600 s los

que mostraron la velocidad específica de producción de AcM y el rendimiento de AcM por célula más altos (Tabla 4).

Se determinó el diámetro celular y la osmolalidad del medio de cultivo durante los cultivos en cada una de las condiciones de cultivo evaluadas, véase Figura 20A y 20B.

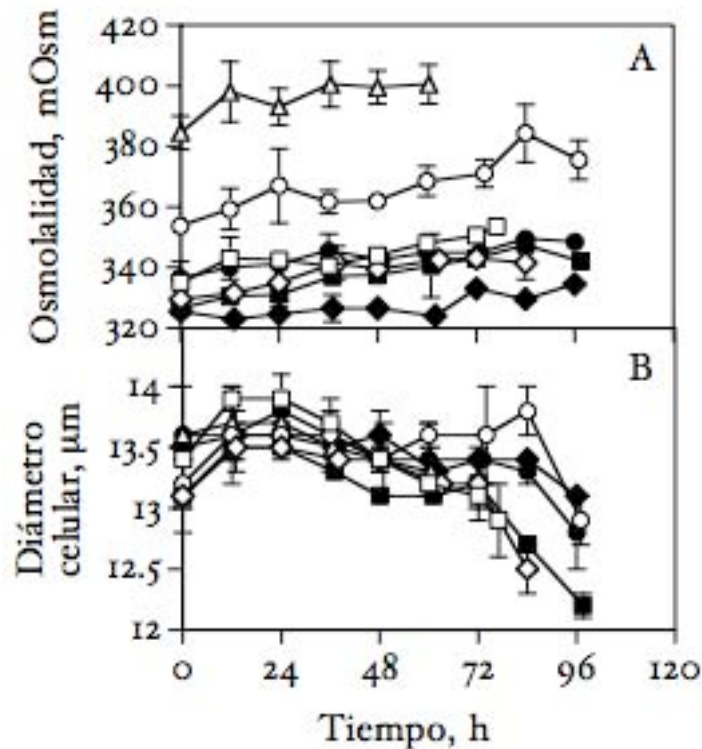


Figura 20. Diámetro celular y osmolalidad del medio de cultivo en los cultivos a pH y dCO₂ constantes (símbolos blancos) y oscilantes (símbolos negros). dCO₂ de 12 mbar (cuadros), dCO₂ de 50 mbar (rombos), dCO₂ de 170 mbar (círculos) y dCO₂ de 250 mbar (triángulos). Periodo de oscilación de 1800 s (cuadros), de 3600 s (rombos) y de 7200 s (círculos).

Se determinó que el diámetro celular promedio en todas las condiciones de cultivo se encontraba entre los 13 y 14 µm. No se observaron cambios de tamaño tanto a lo largo de cada cultivo como entre las diferentes condiciones evaluadas. Con respecto a la osmolalidad del medio de cultivo se observó que en los cultivos a 12 y 50 mbar de dCO₂ y pH constante y los cultivos a 1800 s, 3600 s y 7200 s de periodo de oscilación de dCO₂ y pH oscilante, la osmolalidad se mantuvo entre 320 y 350 mOsm kg⁻¹, por lo tanto

los cambios observados por las diferentes condiciones de cultivo evaluadas no estuvieron influenciados por efectos de osmolalidad. Sin embargo en los cultivos a 170 mbar y 250 mbar las osmolalidades del cultivo estuvieron entre los 360-370 mOsm kg⁻¹ y 380-400 mOsm kg⁻¹ respectivamente, por lo que los efectos observados en estas dos condiciones se deben de considerar como el resultado de un efecto combinado del dCO₂ y la osmolalidad del cultivo.

Se determinó por EC de carbohidratos el patrón de N-glicosilación del AcM producido bajo las diferentes condiciones de cultivo a dCO₂ y pH constante y oscilante. En la Figura 21 se muestran los perfiles electroforéticos representativos del patrón de N-glicosilación del AcM producido en cada una de las diferentes condiciones de cultivo evaluadas. Un total de 31 estructuras de oligosacáridos fueron cuantificadas de acuerdo a su migración en unidades de glucosa (véase Tabla 5). Se propusieron estructuras para la mayoría de los picos identificados basándose en estructuras previamente identificadas y reportadas por Serrato *et al.* (2007) y por las estructuras reportadas en el catálogo de estándares de oligosacáridos de Glyco (Glyco Inc.) utilizando EC bajo las mismas condiciones de operación. El patrón de N-glicosilación se conformó tanto por estructuras de tipo complejo incluyendo estructuras con ácido siálico terminal, como por estructuras de tipo paucimanosa y alta manosa. En los cultivos a dCO₂ y pH constante a 12 y 250 mbar un total de 31 y 30 estructuras fueron identificadas mientras que en los cultivos a 50 y 170 mbar se resolvieron únicamente 25 estructuras que representaron el 80 % de la microheterogeneidad identificada en las otras dos condiciones. En el caso de los cultivos a dCO₂ y pH oscilante con periodos de oscilación de 3600 s y 7200 s un total de 30 y 31 estructuras fueron identificadas respectivamente (igual número que en los cultivos a 12 y 250 mbar), en tanto que en los cultivos a 1800 s solamente se resolvieron 25 estructuras que representaron al igual que para los cultivos a 50 y 170 mbar de dCO₂ y pH constante, el 80 % de la microheterogeneidad determinada en las otras dos condiciones.

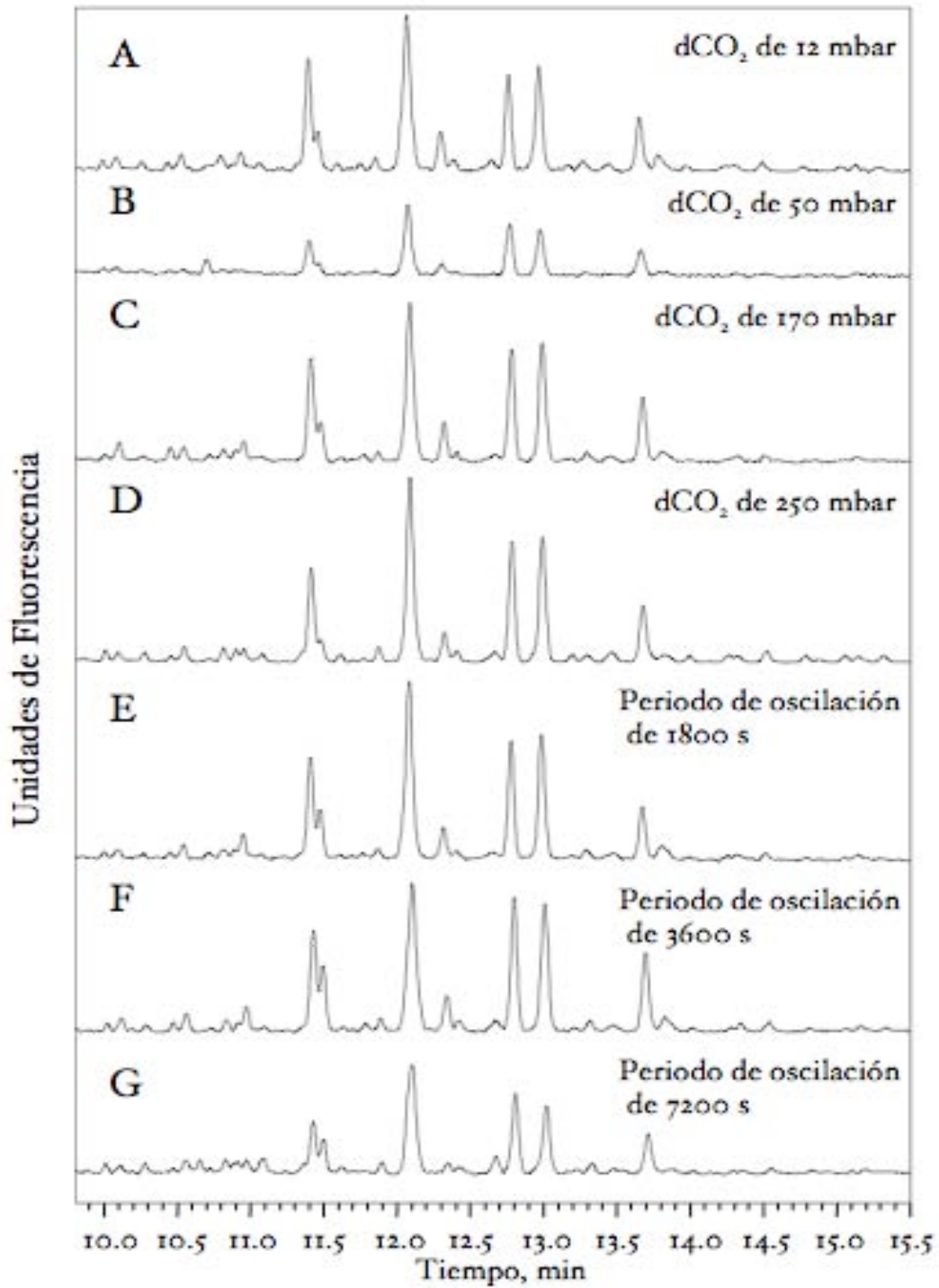


Figura 21. Electroferogramas por EC del patrón de N-glicosilación del AcM producido por cultivos del hibridoma BCF2 bajo condiciones de pH y dCO₂ constantes (A - D) y oscilantes (E - G).

Tabla 5. Identificación y cuantificación de los picos resueltos en el análisis por EC del patrón de N-glicosilación del AcM producido en los cultivos a dCO₂ y pH constante y oscilante.

Pico No.	UG s		Abundancia Relativa (%)												Estructura propuesta
			Cultivos a dCO ₂ constante (mbar)						Cultivos a dCO ₂ oscilante (s)						
			12	50	Dif	170	Dif	250	Dif	1800	Dif	3600	Dif	7200	
1	4.68	0.02	0.7	4.1	0.9	0.4	0.1	1.6	0.6	0.4	0.1	0.5	0.1	1.2	Sialidado
2	4.80	0.02	1.4	4.2	0.4	2.1	0.2	1.0	0.0	1.1	0.1	1.3	0.1	1.2	A ₂ G ₂ S ₂ F
3	5.28	0.02	0.6	3.1	0.7	1.2	0.2	0.2	0.2	0.6	0.0	0.7	0.0	0.4	Sialidado Fucosilado
4	5.40	0.02	1.8	3.0	0.1	1.6	0.1	2.1	0.5	1.5	0.0	1.7	0.2	2.4	M ₃ N ₂ F
5	5.77	0.02	1.7	1.9	0.3	1.3	0.2	1.7	0.4	1.2	0.1	1.1	0.0	2.0	Sialidado
6	5.89	0.02	0.5	1.2	0.1	0.7	0.0	1.1	0.1	0.9	0.1	0.7	0.0	2.3	Complejo
7	5.97	0.02	2.1	2.2	0.1	2.2	0.0	0.9	0.3	2.7	0.0	2.5	0.0	2.1	A ₂ G ₂ S ₁
8	6.14	0.03	0.7	0.5	0.3	0.3	0.0	1.6	0.7	0.1	0.1	0.3	0.1	2.7	Complejo Fucosilado
9	6.63	0.02	15.0	4.8	0.6	15.1	1.1	12.1	0.7	13.4	0.0	11.6	0.0	10.2	A ₂ G ₀
10	6.73	0.02	3.7	5.1	0.1	5.2	0.9	1.6	0.5	5.7	0.4	7.0	0.4	5.3	M ₅
11	6.93	0.03	0.5					1.2	0.6			0.2	0.1	0.7	NI
12	7.16	0.02	0.5	2.0	0.5	0.8	0.2			0.4	0.0	0.6	0.1		Galactosilado
13	7.32	0.02	1.1	2.4	0.2	0.7	0.1	1.8	0.5	0.9	0.0	0.9	0.1	1.2	Galactosilado Fucosilado
14	7.64	0.02	24.9	23.0	0.8	24.8	0.5	25.2	0.4	25.4	1.2	23.3	1.1	27.1	A ₂ G ₀ F
15	8.00	0.02	4.5	0.9	0.1	4.8	0.2	2.7	0.5	3.8	0.2	3.6	0.1	1.2	M ₆
16	8.13	0.03	1.1	1.1	0.2	0.8	0.0	1.3	0.2	0.7	0.1	1.0	0.0	0.9	A ₂ G ₀ FB
17	8.53	0.02	1.2	1.2	0.1	1.0	0.2	1.4	0.0	0.9	0.0	1.4	0.0	2.4	M ₇
18	8.72	0.02	10.5	11.2	0.9	12.2	1.0	12.6	0.6	13.3	0.2	13.6	0.0	13.5	A ₂ G _{1(1,6)} F
19	9.05	0.02	13.5	11.4	1.2	14.0	1.0	14.7	0.4	15.2	0.0	14.3	0.1	12.0	A ₂ G _{1(1,3)} F
20	9.37	0.03	0.5					0.7	0.1			0.2	0.0	0.2	NI
21	9.53	0.02	1.1	2.0	0.2	1.0	0.2	0.3	0.3	1.0	0.0	1.0	0.1	1.1	M ₈
22	9.79	0.02	0.8	1.2	0.1	0.4	0.0	1.1	0.2	0.7	0.1	0.7	0.0	0.6	Complejo Fucosilado
23	10.13	0.03	6.2	5.7	0.4	6.5	0.9	6.8	0.1	6.1	0.3	7.6	0.4	6.5	A ₂ G ₂ F
24	10.34	0.03	1.8	2.7	0.1	1.7	0.1	1.0	0.2	2.2	0.0	1.8	0.1	0.5	M ₉
25	10.62	0.04	0.4					0.7	0.2			0.2	0.0	0.4	NI
26	11.05	0.03	0.5					0.9	0.2			0.2	0.1	0.3	NI
27	11.15	0.02	0.6	1.8	0.0	0.5	0.1	0.6	0.0	0.6	0.1	0.6	0.0	0.3	Galactosilado Fucosilado
28	11.45	0.03	0.8	0.8	0.0	0.5	0.1	1.1	0.1	0.5	0.0	0.7	0.1	0.4	Galactosilado
29	11.86	0.03	0.4					0.7	0.1			0.2	0.0	0.3	NI
30	12.26	0.03	0.4					0.8	0.2			0.4	0.0	0.2	NI
31	12.41	0.02	0.5	1.8	0.0	0.4	0.0	0.4	0.1	0.5	0.1	0.2	0.0	0.4	Fucosilado

s, desviación estándar de 7 muestras. Dif, diferencia del promedio entre dos muestras.
NI, no identificado.

Los seis picos adicionales identificados en los cultivos a 12 y 250 mbar de dCO₂ y pH constante, así como a 3600 y 7200 s de pH y dCO₂ oscilante correspondieron de acuerdo a sus UG a las mismas estructuras. Dichas estructuras que de manera individual no representaron más del 1 % de abundancia relativa, en su conjunto representaron el 2.7 %, 5.0 %, 1.4 % y 2.1 % del contenido total de glicanos en su respectiva condición de cultivo. No se determinó una probable estructura para dichos oligosacáridos. En todas las condiciones evaluadas se identificaron las 4 estructuras de N-glicanos complejos características y más abundantes presentes en IgG: A₂G₀F, A₂G_{1(1,6)}F, A₂G_{1(1,3)}F y A₂G₂F. Entre las estructuras de tipo complejo con ácido siálico terminal se identificaron a los oligosacáridos A₂G₂S₂F y A₂G₂S₁. Con respecto a las estructuras altas en manosa se identificaron las estructuras correspondientes a M₅, M₆, M₇, M₈ y M₉. En la **Figura 22** se muestra un esquema con las representaciones gráficas de las estructuras propuestas más abundantes que se identificaron. La mayoría de las estructuras de oligosacáridos identificados no mostró cambios en su porcentaje relativo de aparición bajo las diferentes condiciones de cultivo evaluadas. En el caso de los cultivos a 50 mbar de dCO₂ y pH constante representativos de una condición de cultivo fisiológica sin gradientes, se observó en comparación con las demás condiciones de cultivo, un incremento en el porcentaje relativo de los picos 1, 2 y 3 correspondientes a oligosacáridos sializados. Se determinó además bajo dicha condición de cultivo que el pico 9 correspondiente a la estructura de tipo complejo sin galactosas terminales A₂G₀ disminuyó su porcentaje relativo de aparición en más del 50 %. También se determinó una disminución en el porcentaje relativo de aparición del pico 7 correspondiente al oligosacárido sializado A₂G₂S₁ en los cultivos a 250 mbar de dCO₂ y pH constante en comparación con las demás condiciones de cultivo evaluadas.

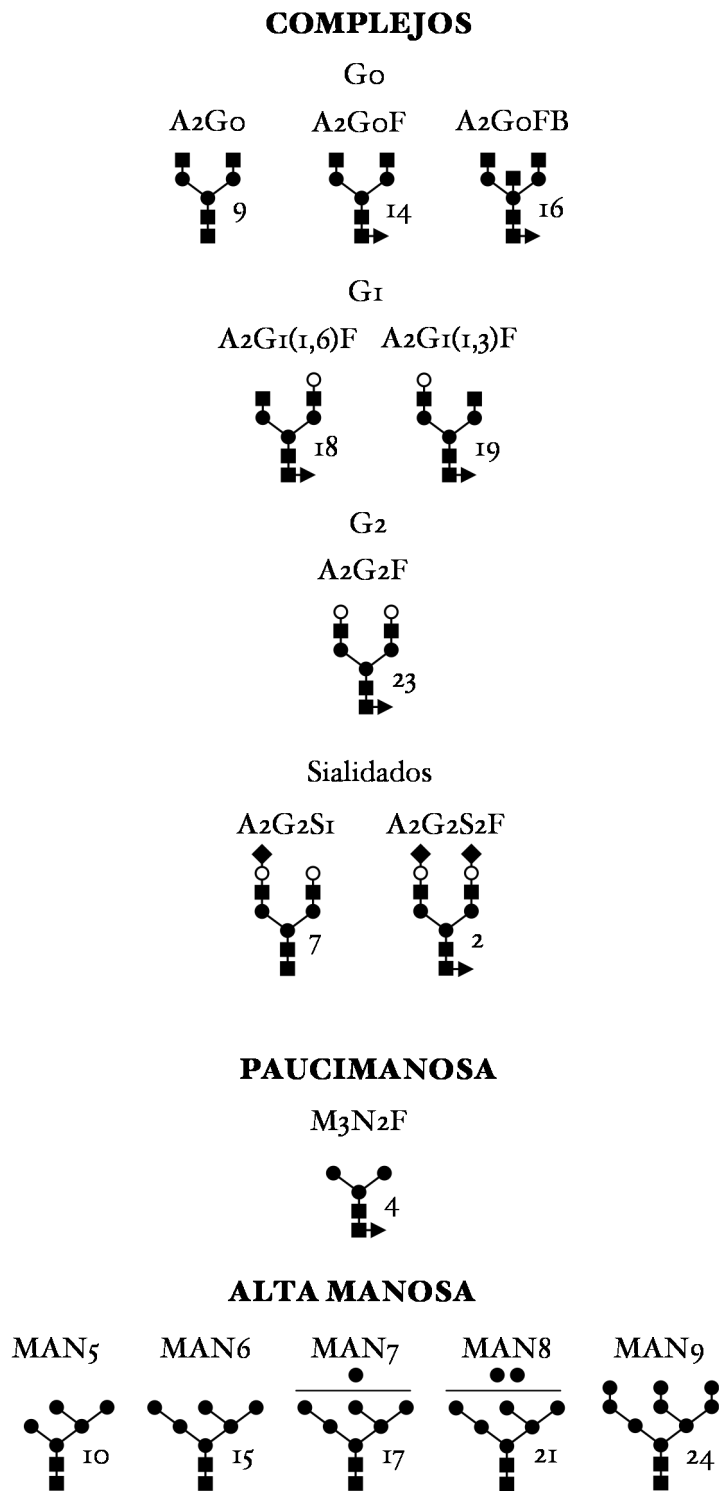


Figura 22. Representación gráfica de las principales estructuras de oligosacáridos presentes en el AcM producido por el hibridoma BCF₂ en cultivo bajo condiciones constantes y oscilantes de pH y dCO₂. El número a la derecha de cada estructura indica el número de pico, como se describe en la Tabla 5.

Agrupando a las 31 estructuras de glicanos identificados de acuerdo con los principales grupos de oligosacáridos (véase Tabla 6), no se observaron diferencias en el porcentaje relativo de aparición de los oligosacáridos de tipo paucimanosa, alta manosa, de tipo complejo, oligosacáridos galactosilados y oligosacáridos fucosilados, bajo las diferentes condiciones de cultivo evaluadas. En los cultivos a 50 mbar de dCO₂ y pH constante fue donde se observaron los cambios más importantes. Se determinó que el porcentaje de estructuras complejas sializadas se duplicó pasando de aprox. un 6 % para las demás condiciones de cultivo, a aprox. un 15 % en la condición en cuestión. También se determinó una disminución en el porcentaje de estructuras de tipo Go, pasando del un 35-40 % para las demás condiciones de cultivo a un 29 % en dicha condición .

Tabla 6. Abundancia relativa de los principales grupos de oligosacáridos presentes en el AcM producido en los cultivos a dCO₂ y pH constante y oscilante.

Grupo de Glicanos	Abundancia Relativa (%)											
	Cultivos a dCO ₂ cte (mbar)						Cultivos a dCO ₂ oscilante (s)					
	12	50	Dif	170	Dif	250	Dif	1800	Dif	3600	Dif	7200
Complejos	83.2	84.1	7.6	84.7	5.7	85.9	5.7	84.7	2.7	82.2	2.4	84.9
Alta Manosa	12.4	11.9	0.6	13.7	1.7	7.0	1.5	13.7	0.7	14.7	0.8	10.6
Paucimanosa	1.8	3.0	0.1	1.6	0.1	2.1	0.5	1.5	0.0	1.7	0.2	2.4
NI	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	1.3	0.0	0.0	1.4	0.2	2.1
Go	41.0	28.9	1.6	40.7	1.6	38.7	1.3	39.4	1.3	35.8	1.1	38.2
G1	24.0	22.6	2.0	26.2	1.9	27.3	1.0	28.5	0.2	27.9	0.2	25.5
G2	6.2	5.7	0.4	6.5	0.9	6.8	0.1	6.1	0.3	7.6	0.4	6.5
Sializados	6.6	15.4	2.5	7.0	0.7	5.4	1.6	6.0	0.4	6.1	0.3	6.9
Galactosilados	33.2	35.2	3.1	35.2	3.4	37.7	1.7	37.1	0.7	38.4	0.9	33.9
Fucosilados	63.7	70.2	5.1	65.4	4.1	69.5	3.9	66.7	2.3	66.2	2.2	69.2

Dif, Diferencia del promedio entre dos muestras. NI, no identificados.

Los cultivos llevados a cabo a $d\text{CO}_2$ fisiológico (50 mbar) mostraron ser la condición en la que se alcanzaron las mayores concentraciones celulares viable y total, los más altos rendimientos de células por glucosa y por glutamina así como la más alta velocidad específica de crecimiento (esta última fue igual también en los cultivos a 12 mbar) por lo que podemos considerar a esta condición de cultivo como la más favorable para alcanzar un óptimo crecimiento celular (entendiéndose por óptimo crecimiento celular a la más alta velocidad específica de crecimiento con las más altas concentraciones celulares). Sin embargo, bajo esta condición de cultivo no se alcanzaron ni la más alta concentración de AcM ni la mayor velocidad específica de producción de AcM o el mayor rendimiento de AcM por célula. De hecho el rendimiento de AcM por célula fue el más bajo en comparación con las demás condiciones evaluadas. Por otro lado en los cultivos a 170 mbar de $d\text{CO}_2$, que es una condición de hipercapnia, se observó un efecto negativo en el crecimiento celular alcanzándose menores concentraciones celulares viable y total, una menor velocidad específica de crecimiento y una disminución en los rendimientos de células por glucosa y por glutamina. Sin embargo bajo esta condición de cultivo se alcanzaron una mayor concentración final de AcM y velocidad específica de producción de AcM. Este fenómeno de buen crecimiento celular con baja producción de AcM y viceversa, ha sido estudiado ya por otros autores, los cuales han determinado que dichos cambios entre los procesos de crecimiento celular y producción de proteína están directamente relacionados con la regulación del ciclo celular en respuesta a alteraciones del medioambiente extracelular (Ramírez y Mutharasan, 1990; Abu-Absi y Srienc, 2001; Lloid y Al-Rubeai, 2001). Algunos estudios muestran que cuando la velocidad de crecimiento disminuye por efecto de la manipulación de algún parámetro de cultivo, la velocidad específica de secreción de AcM en la fase G1 del ciclo celular aumenta (cabe mencionar que la disminución del crecimiento celular con el correspondiente incremento en la producción de proteína por efecto de la concentración de CO_2 no ha sido extensivamente estudiado, con la

excepción de algunos experimentos realizados en el estudio de [Yoon et al. \(2001\)](#)). También se ha observado que cuando hay un rápido crecimiento celular una mayor proporción de las células se encuentra en la fase S del ciclo celular, fase en la que se ha observado una baja velocidad específica de acumulación y secreción de AcM, pero cuando las células se encuentran en crecimiento lento una mayor proporción de las células se encuentran en la fase G₁, fase del ciclo en la que se ha observado una alta velocidad de acumulación y secreción de AcM. En el caso de los cultivos a 12 mbar de dCO₂ (hipocapnia) si bien se observó una cinética y velocidad específica de crecimiento similar a la de los cultivos a concentración fisiológica de dCO₂, el tiempo total de cultivo fue siete horas menor y las concentraciones celulares viable y total máximas alcanzadas fueron menores. A nivel metabólico se observó que la concentración máxima de lactato producido, los rendimientos de lactato por célula y lactato por glucosa así como las velocidades específicas de producción de lactato y de consumo de glucosa fueron las más altas alcanzadas. También se observó que los rendimientos de células por glucosa y células por glutamina fueron menores que para los cultivos a concentración fisiológica de dCO₂. Los resultados anteriores en su conjunto mostraron que en los cultivos a 12 mbar de dCO₂ se alteró importantemente el metabolismo energético, si bien no se afectó la velocidad específica máxima de crecimiento celular, sí se presentó un derroche energético importante vía glicólisis aerobia que limitó la disponibilidad de las fuentes de carbono y energía para prolongar el tiempo de cultivo y alcanzar concentraciones celulares comparables a la de los cultivos a dCO₂ fisiológico. Interesantemente en dichos cultivos a 12 mbar de dCO₂ la velocidad específica de producción de AcM y la productividad volumétrica de AcM fueron las más altas alcanzadas en comparación con las demás condiciones evaluadas. Además, la concentración final de AcM alcanzada fue al igual que para los cultivos a 170 mbar (alcanzaron la misma concentración aunque los cultivos a 170 mbar con 20 h más de cultivo) mayor que para los cultivos a dCO₂ fisiológico y a 250 mbar de dCO₂. Se

puede considerar a la condición a 12 mbar de dCO₂ (subfisiológica) como la óptima para producción de AcM. Dada la preocupación que se tiene con respecto a los efectos negativos en el crecimiento celular y la productividad de los cultivos expuestos a altas concentraciones de dCO₂, la mayoría de los estudios se han enfocado en evaluar condiciones de hipercapnia contra cultivos control a la concentración fisiológica (deZengotita *et al.*, 1998, 2002a, 2002b; Garnier *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1996; Kimura y Miller, 1996, 1997; Mostafa y Gu, 2003; Schmelzer y Miller, 2002a, 2002b; Takuma *et al.*, 2007; Zanghi *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2005). Por otro lado, como resultado de estudios realizados durante la época del desarrollo de medios de cultivo para crecer células animales *in vitro*, se llegó a la conclusión de que la ausencia de CO₂ puede inhibir el crecimiento de muchas líneas celulares, sobre todo a baja densidad celular, por lo que era esencial utilizar una concentración de CO₂ fisiológica para evitar problemas con la proliferación celular (Freshney, 2005). Existe muy poca información en la literatura con respecto al efecto de condiciones de hipocapnia en el crecimiento y metabolismo celular así como en la productividad y glicosilación de la proteína de interés. A nuestro conocimiento sólo en el trabajo de Yoon *et al.* (2001) han evaluado el efecto de concentraciones subfisiológicas de CO₂ en el crecimiento y metabolismo de células CHO así como en la producción y glicosilación de proteínas (eritropoyetina humana recombinante en el caso de dicho estudio). De acuerdo con los resultados de Yoon *et al.* (2001) el someter a las células a porcentajes de CO₂ en la fase gaseosa entre 0.5 y 5 % (aprox. 5 y 50 mbar) no tuvo efectos en el crecimiento ni en la producción de proteína recombinante. Sin embargo, en cultivos llevados a cabo en ausencia de CO₂ observaron un lento crecimiento al inicio del cultivo seguido de un cese en el mismo. Interesantemente en esta condición la velocidad específica de producción de eritropoyetina fue tres veces mayor a la obtenida en los cultivos a 5 % de CO₂, lo cual se vió reflejado en un aumento significativo de la producción total de proteína recombinante. Los autores proponen que el aumento en la producción de la proteína recombinante en los cultivos en

ausencia de CO₂ pudo deberse a un arresto celular en la fase G₀-G₁ de ciclo celular. La literatura muestra que las células de mamífero arrestadas por medios físicos o químicos en la fase G₁ del ciclo celular cesan la proliferación y producen mayores concentraciones de proteína recombinante (Cherlet y Marc, 2000). En nuestro caso los aumentos observados en la velocidad específica de producción y concentración final de AcM en los cultivos en hipocapnia (con respecto a los cultivos a concentración fisiológica) no parecen ser el resultado de un arresto celular debido a que las cinéticas y velocidades de crecimiento fueron similares en ambas condiciones. Sin embargo sí se observaron diferencias en el metabolismo de glucosa, glutamina y lactato que se tradujeron en menores concentraciones celulares y un aumento de la productividad de AcM. Dichos cambios observados en los cultivos a 12 mbar se podrían considerar como los eventos metabólicos que se presentan ante una limitación de CO₂ pero sin llegar a un arresto celular como en un cultivo en ausencia de CO₂. A medida que se aumentó el dCO₂ por encima de la concentración fisiológica, es decir en los cultivos en hipercapnia (170 y 250 mbar) se observó un efecto negativo dependiente de la concentración en el crecimiento y metabolismo celular. Sin embargo como ya se mencionó arriba para el caso de los cultivos a 170 mbar la velocidad y producción de AcM se vieron favorecidas. En los cultivos a 250 mbar de dCO₂ no fue el caso. Dado el limitado crecimiento celular, la concentración final, velocidad de producción y productividad de AcM fueron las más bajas. Y dado los bajos rendimientos obtenidos de células por glucosa y por glutamina así como las altas velocidades de consumo de dichos metabolitos en los cultivos a 250 mbar, es claro el derroche energético de las células para contender con la alta concentración de dCO₂ y la alta osmolalidad presente en dichos cultivos.

Aún cuando es una realidad que los cultivos de células animales a gran escala o con alta densidad celular no operan bajo condiciones de cultivo homogéneas (Langheinrich *et al.*, 1998; Lara *et al.*, 2006; Lidén, 2002; Nienow *et al.*, 1996; Palomares y Ramírez, 2000; Tramper *et al.*, 1996; Wayte

et al., 1997) poca información existe en la literatura con respecto al estudio del desempeño de los cultivos de células animales ante condiciones heterogéneas en las variables de cultivo y nula con respecto a condiciones fluctuantes de dCO_2 y pH, por lo tanto los resultados de este estudio representan el primer acercamiento para el entendimiento de lo que sucede o puede llegar a suceder durante la operación de los reactores de células animales a gran escala o de altas concentraciones celulares con problemas de heterogeneidad de dCO_2 y pH. En su conjunto cuando comparamos los resultados de las tres condiciones oscilatorias de dCO_2 y pH, se observó un comportamiento negativo, tanto en el crecimiento como en el metabolismo celular y la producción de AcM a medida que se incrementó el periodo de oscilación. Dicho comportamiento era de esperarse dado que a medida que se incrementó el periodo de oscilación, la magnitud de los gradientes de dCO_2 y pH se incrementaron también. En el caso de los cultivos oscilados, los efectos observados se deben única y exclusivamente a las fluctuaciones de dCO_2 y pH y no a incrementos de osmolalidad como es el caso de los cultivos a 170 y 250 mbar de dCO_2 y pH constante. Los tiempos de cultivo se prolongaron 12 h más y las velocidades de crecimiento fueron menores en comparación con los cultivos a dCO_2 fisiológico. Sin embargo las concentraciones de AcM alcanzadas bajo las condiciones oscilatorias a 1800 y 3600 s fueron mayores a las alcanzadas en los cultivos a dCO_2 y pH constante, lo cual sugiere que las condiciones heterogéneas presentes en un biorreactor pueden incluso mejorar el desempeño del cultivo (Lidén, 2002). Con respecto al efecto de las diferentes condiciones de cultivo a dCO_2 y pH tanto constante como oscilante sobre el patrón de N-glicosilación del AcM, se determinó un menor número de estructuras de oligosacáridos en los cultivos a 50 mbar y a 1800 s de periodo de oscilación. Además, en los cultivos a dCO_2 fisiológico de 50 mbar se determinó un incremento en el porcentaje relativo de estructuras sializadas a expensas de estructuras de tipo Go. Los resultados anteriores mostraron que las condiciones de cultivo adversas y/o heterogéneas alteraron el proceso

de glicosilación del AcM dando como resultado un patrón de glicosilación más heterogéneo (de 26 a 31 estructuras) y con un menor nivel de procesamiento.

EN COMPARACIÓN CON DMEM-SFB: EFECTO EN EL CRECIMIENTO, METABOLISMO Y PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DEL ACM

Se realizaron cultivos por lote en frascos T-75 con 15 mL de medio de cultivo, por triplicado. Se determinó el efecto en el crecimiento, metabolismo y patrón de glicosilación del AcM producido por el hibridoma BCF2 al ser cultivado en dos medios comerciales específicos para hibridomas: medio libre de suero (SFM) y medio químicamente definido (CDM), en comparación a los cultivos tradicionales con medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (DMEM-SFB).

Los cultivos de hibridomas en el medio CDM resultaron ser los que mayor concentración celular viable y total alcanzaron (2.9×10^6 y 3.7×10^6 cel mL⁻¹ respectivamente) en comparación con los medios SFM y DMEM-SFB (Figuras 23A y 23B). La viabilidad se comportó de forma similar en los tres medios de cultivo utilizados (Figura 23C). Los cultivos en CDM y DMEM-SFB mostraron la misma velocidad específica de crecimiento máxima de 0.040 h^{-1} , mientras que en los cultivos en SFM se incremento a 0.054 h^{-1} , ver Tabla 7. Los tres medios de cultivo tuvieron diferentes concentraciones de glucosa y glutamina como se observa en los valores al inicio de los cultivos, ver Figura 24A, 24C y Tabla 7. Tales diferencias en general no mostraron estar correlacionadas con los resultados de los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para los tres medios. Interesantemente los valores más altos para la acumulación de lactato, ver Figura 24B, el rendimiento de lactato (por glucosa y por célula) y la velocidad de producción de lactato, se observaron en los cultivos en medio DMEM-SFB. La concentración máxima de AcM al final de los cultivos resultó prácticamente igual entre los cultivos con medios SFM y CDM, ver Figura 24D y Tabla 7, no así para los cultivos en medio DMEM-SFB, el

cual resultó con una concentración ca. 25 % menor que en los otros medios. Sin embargo, las velocidades específicas de producción de AcM durante la etapa de crecimiento exponencial fueron igual para los tres cultivos, a pesar de que el rendimiento celular de AcM fue más bajo en SFM.

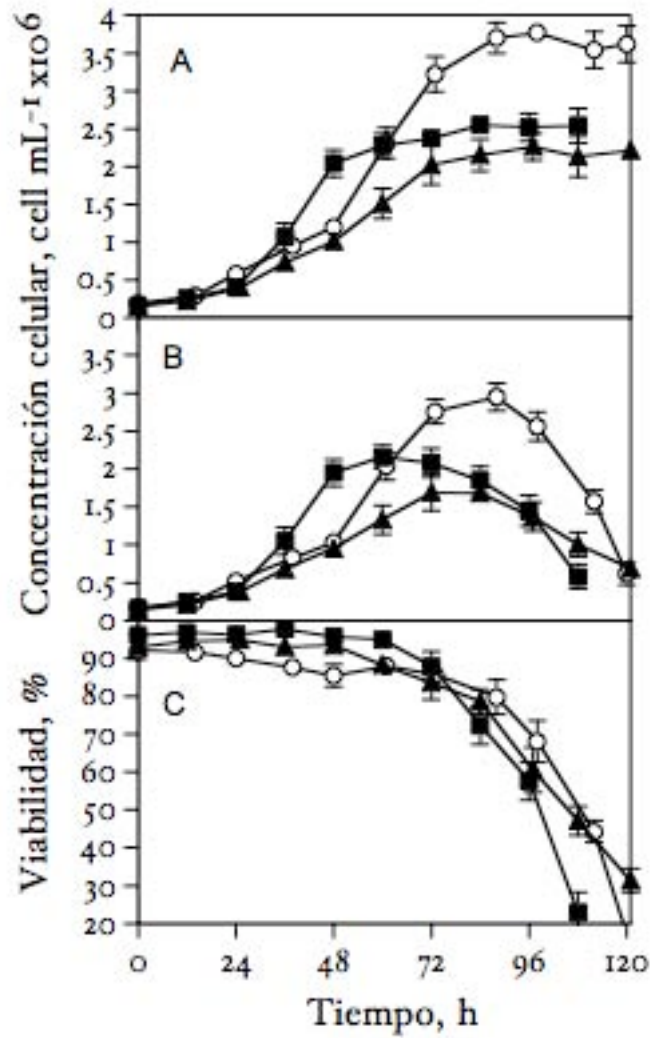


Figura 23. Crecimiento celular en medio de cultivo SFM (cuadros), DMEM-SFB (triángulos) y CDM (círculos). (A) concentración celular total, (B) concentración celular viable y (C) viabilidad.

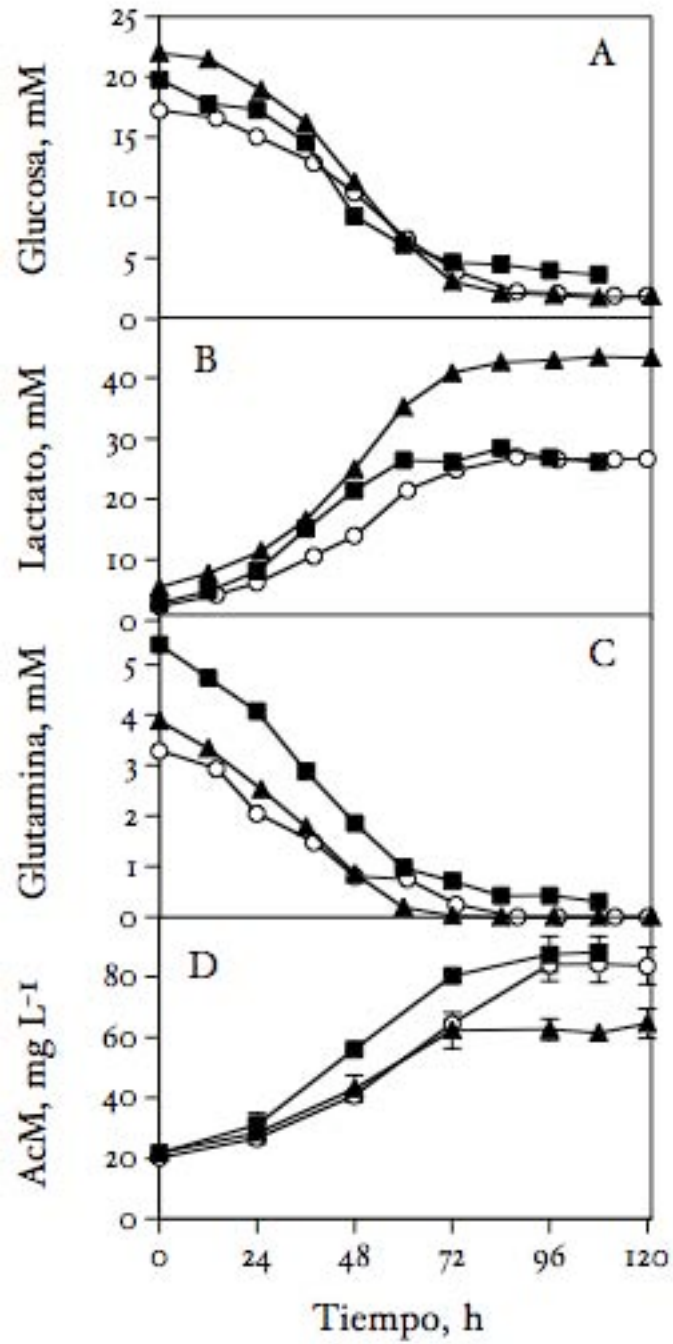


Figura 24. Cinéticas de consumo y producción de metabolitos y AcM en medio SFM (cuadros), DMEM-SFB (triángulos) y CDM (círculos).

Tabla 7. Principales parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos realizados en los tres diferentes medios de cultivo analizados. Y, rendimiento. q, velocidad específica de consumo o producción de: Glc, Lac, Gln, AcM. Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de experimentos realizados por triplicado.

Coeficiente	Medio		
	SFM	DMEM-FBS	CDM
$X_{t \max} \times 10^6$ (cel mL ⁻¹)	2.55 (0.13)	2.26 (0.18)	3.77 (0.10)
$X_{v \max} \times 10^6$ (cel mL ⁻¹)	2.16 (0.15)	1.69 (0.24)	2.95 (0.18)
AcM _{max} (mg L ⁻¹)	87.98 (5.41)	64.64 (4.88)	83.61 (6.04)
Glc _{init} (mM)	19.78 (0.68)	21.96 (0.12)	17.24 (0.41)
Lac _{max} (mM)	28.41 (1.33)	43.48 (0.72)	26.96 (0.42)
Gln _{init} (mM)	5.39 (0.02)	3.88 (0.03)	3.29 (0.04)
μ (h ⁻¹)	0.054 (0.003)	0.042 (0.002)	0.040 (0.002)
Y _{Lac/Glc} (mol mol ⁻¹)	1.44 (0.07)	1.89 (0.003)	1.59 (0.05)
Y _{cel/Glc} (cel pmol ⁻¹)	0.18 (0.02)	0.07 (0.01)	0.17 (0.03)
Y _{cel/Gln} (cel pmol ⁻¹)	0.51 (0.03)	0.28 (0.01)	0.35 (0.04)
Y _{Lac/cel} (pmol cel ⁻¹)	9.30 (1.25)	22.53 (1.07)	9.97 (0.87)
Y _{AcM/cel} (pg cel ⁻¹)	18.07 (1.7)	25.90 (1.65)	24.2 (3.24)
q _{Glc} (pmol h ⁻¹ cel ⁻¹)	0.30 (0.02)	0.58 (0.07)	0.24 (0.02)
q _{Gln} (pmol h ⁻¹ cel ⁻¹)	0.11 (0.002)	0.15 (0.010)	0.11 (0.008)
q _{Lac} (pmol h ⁻¹ cel ⁻¹)	0.50 (0.05)	0.95 (0.08)	0.40 (0.02)
q _{AcM} (pg h ⁻¹ cel ⁻¹)	0.97 (0.061)	1.09 (0.112)	0.97 (0.078)

init= inicial

En general, los medios SFM y CDM promovieron un mejor crecimiento, resultando en más altos rendimientos celulares (número de células generadas por pmol de glucosa o glutamina) y concentraciones máximas de AcM (Tabla 7). Además, la adaptación de los hibridomas al crecimiento en los medios SFM y CDM, ocasionó que las células perdieran completamente la habilidad para adherirse a la superficie de los frascos de cultivo.

Se determinaron las actividades enzimáticas extracelulares β -galactosidasa, β -N-acetilhexosaminidasa y α -manosidasa en el sobrenadante de los cultivos celulares. Se detectaron actividades exoglicosidasas iniciales en medio DMEM-SFB, lo que evidencia una desventaja con respecto al uso de SFB, véase la **Figura 25 en tiempo 0**.

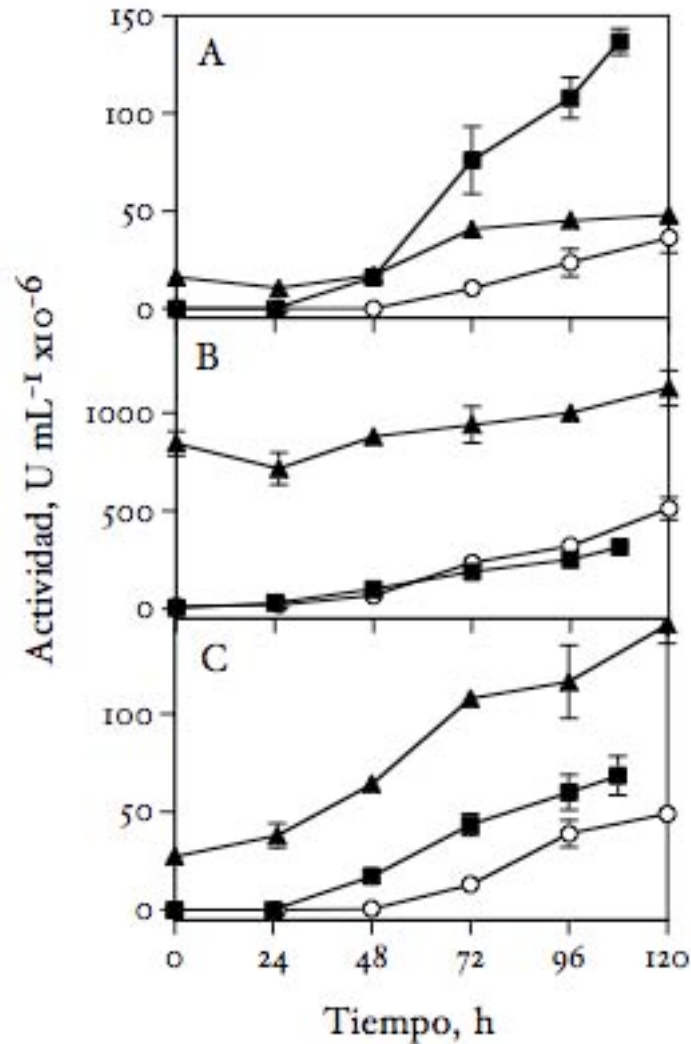


Figura 25. Actividades exoglicosidasas analizadas en el sobrenadante de los medios de cultivo SFM (cuadros), DMEM-SFB (triángulos) y CDM (círculos). (A) Actividad β -galactosidasa, (B) actividad β -hexosaminidasa y (C) actividad α -manosidasa.

Como se observa en la **Figura 25A**, la más alta actividad β -galactosidasa y velocidad de producción durante el cultivo fue observada en el medio SFM ($137 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$ y $1.27 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente). La actividad final de β -galactosidasa fue 3 a 4 veces mayor en los cultivos SFM en comparación con los cultivos en CDM y DMEM-SFB, los cuales alcanzaron valores similares (36×10^{-6} y $48 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente). La actividad inicial β -N-acetilhexosaminidasa (hexosaminidasa) en los cultivos DMEM-SFB fue sustancialmente superior ($843 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$) que en los cultivos con medios SFM y CDM los cuales mostraron una actividad mínima o cercana a 0 (**Figura 25B**). Sin embargo la velocidad de producción de β -N-acetilhexosaminidasa fue más baja en DMEM-SFB ($2.4 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$), en comparación con la de los cultivos en SFM y CDM (2.9×10^{-6} y $4.3 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente). En el caso de las determinaciones de actividad de α -manosidasa, los cultivos en DMEM-SFB alcanzaron el valor más alto al final del cultivo ($145 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$), que fue más del doble de actividad que en los cultivos CDM y SFM (**Figura 25C**). De forma análoga a los resultados obtenidos para las actividades β -galactosidasa y β -N-acetilhexosaminidasa, una alta actividad inicial α -manosidasa estuvo presente en los cultivos en medio DMEM-SFB ($27 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$), mientras que en los otros dos medios de cultivo fue prácticamente indetectable. Con la finalidad de determinar si las actividades exoglicosidasas medidas en el ensayo realmente ejercían un efecto sobre los oligosacáridos del AcM bajo las condiciones del medio de cultivo, los N-glicanos del AcM BCF₂, liberados y marcados fluorescentemente, fueron incubados por 21 h a 37 °C en los sobrenadantes de los tres medios de cultivo. Las estructuras que correspondieron a productos de degradación (por debajo de 5 UG) se incrementaron a 25.5, 34.8 y 50.8 % en SFM, CDM y DMEM-SFB respectivamente, en comparación con el 3.9 % presente

al inicio de la incubación. En contraste, estructuras correspondientes a glicanos complejos (mayores a 5 UG) disminuyeron a 74.5, 65.2 y 49.2 % en SFM, CDM y DMEM-SFB respectivamente en comparación con el 96.1 % presente antes de la incubación.

Con respecto a los análisis de glicosilación del AcM producido en los tres medios de cultivo, los oligosacáridos liberados del AcM purificados de los sobrenadantes al final de los cultivos, fueron analizados individualmente por EC. Los electroferogramas representativos de los patrones de N-glicosilación del AcM producido en los tres medios de de cultivo se muestran en la **Figura 26**. En la **Figura 26A** se muestran los 26 picos correspondientes a los oligosacáridos asociados con el AcM producido en medio DMEM-SFB. Con respecto a los oligosacáridos presentes en el AcM producido en los medios SFM y CDM, solamente 22 y 24 picos de los 26 detectados en DMEM-SFB, estuvieron presentes respectivamente (**Figuras 26B y 26C**).

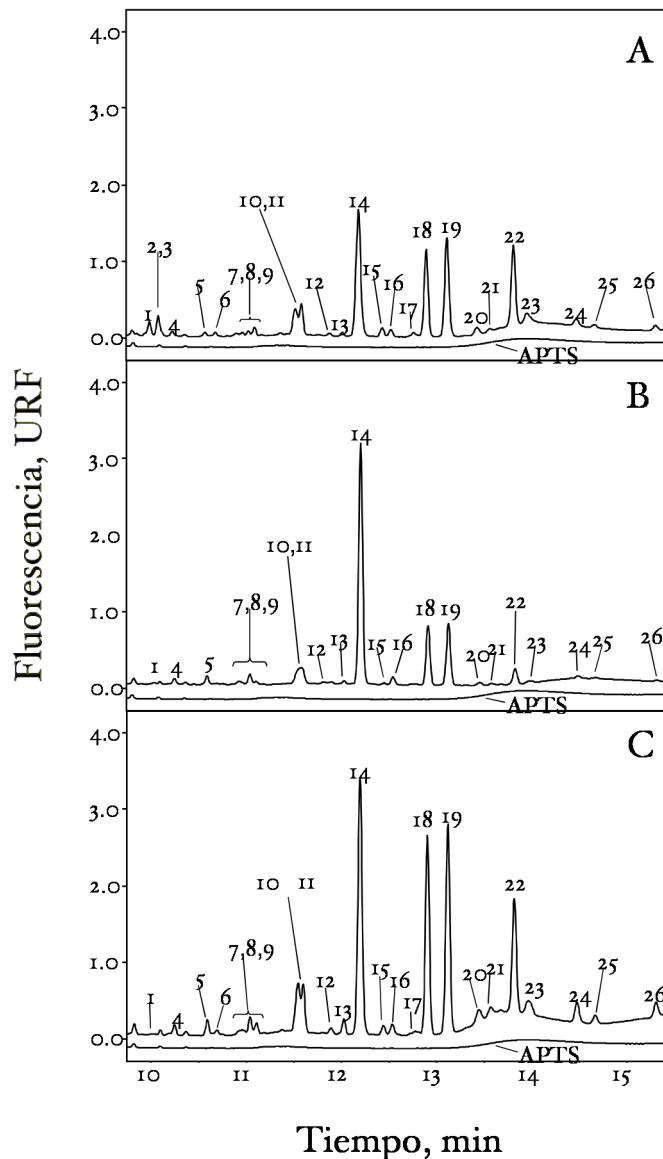


Figura 26. Electroferogramas de los N-glicanos liberados del AcM producido en los tres diferentes medios de cultivo. (A) medio DMEM-SFB, (B) medio SFM y (C) medio CDM. Los números sobre los picos representan la estructura correspondiente de acuerdo a la Tabla 8.

Como se describió en la sección de materiales y métodos, basándose en el tiempo de migración de los picos en UG, su susceptibilidad a la digestión con exoglicosidasas específicas y la disponibilidad de estructuras reportadas en la literatura bajo el mismo método, se logró proponer una estructura de oligosacárido para los picos más abundantes presentes en el AcM, ver [Figura 27 y Tabla 8](#).

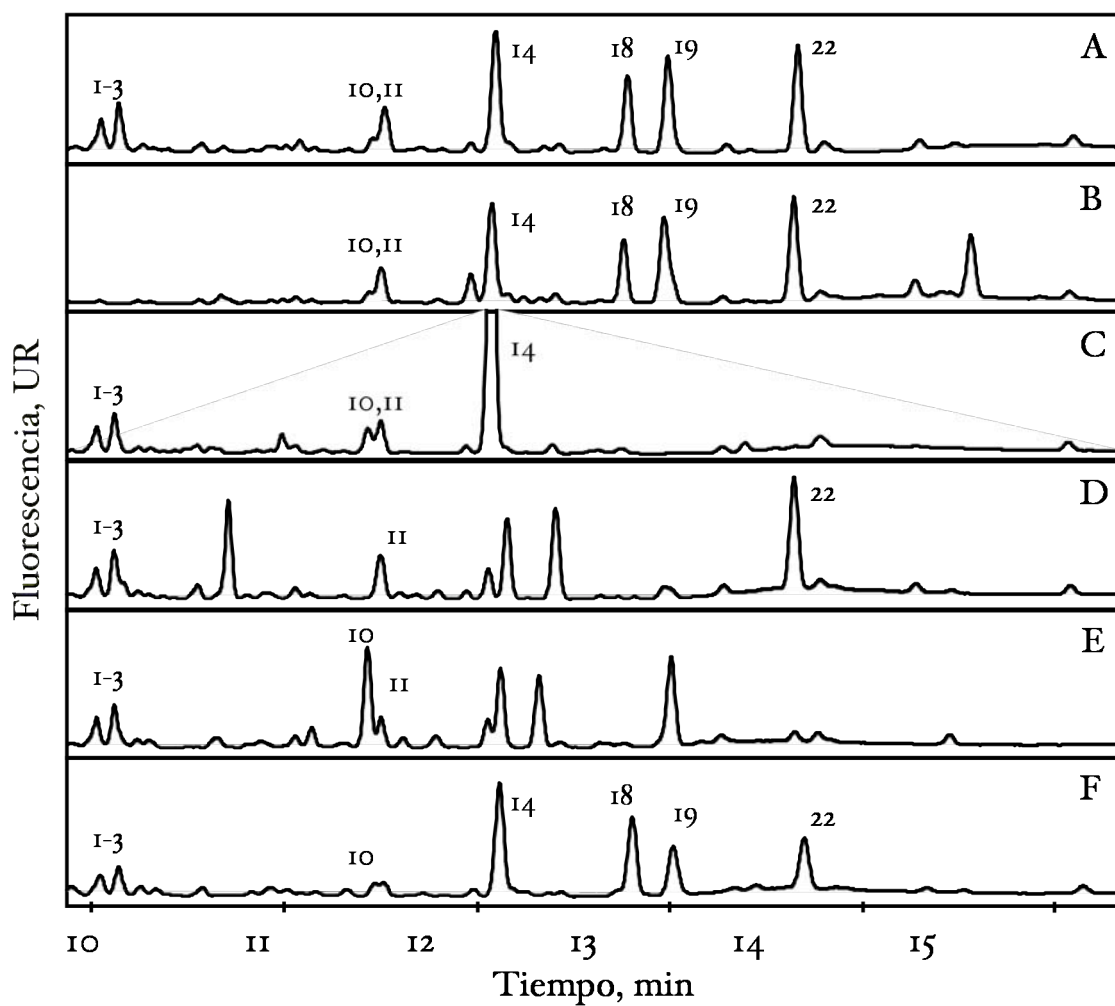


Figura 27. Electroferogramas de las digestiones de los N-glicanos con exoglicosidasas del AcM producido en medio DMEM-SFB. (A) Muestra sin digerir. (B-F) Muestra digerida con sialidasa (B), β -galactosidasa (C), hexosaminidasa (D), fucosidasa (E) y manosidasa (F). El número en los picos corresponde a las estructuras propuestas descritas en la Tabla 8 y Figura 28.

Tabla 8. Identificación y cuantificación de los picos resueltos en el análisis del patrón de N-glicosilación del AcM producido en los tres diferentes medios de cultivo analizados.

Pico No.	UG	Abundancia relativa, %								Digestión con exoglicosidasas					Estructura propuesta	
		SFM	Dif	DMEM-SFB	Dif	CDM	Dif	Sial	Gal	Hex	Man	Fuc				
Maltosa	1.99	0.01														
1	4.59	0.03	0.3	0.0	3.5	1.3	0.4	0.3	+	-	-	-	-			A₂G₂S₂
2	4.68	0.01	0.0	0.0	4.8	1.7	0.0	0.0	+	-	-	-	-			Sialidado
3	4.72	0.00	0.0	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	+	-	-	-	-			Sialidado
4	4.87	0.01	1.0	0.2	0.7	0.1	0.9	0.1	+	-	-	-	-			Sialidado
5	5.32	0.02	1.6	0.0	0.6	0.1	1.5	0.1	+	-	-	-	+			Sialidado
6	5.46	0.01	0.0	0.0	0.6	0.1	0.6	0.1	-	-	-	+	+			M₃N₂F
7	5.77	0.01	1.0	0.1	0.7	0.2	0.4	0.1	+	+	-	-	-			Sialidado
8	5.93	0.02	2.1	0.0	0.6	0.1	1.4	0.1	-	-	+	-	+			Complejo
9	6.02	0.01	0.5	0.0	1.3	0.0	1.1	0.2	-	-	-	+	-			Paucimanosa
10	6.65	0.03	3.4	0.0	4.6	0.5	5.2	0.3	-	-	+	-	-			A₂G₀
11	6.72	0.01	3.9	0.2	4.9	0.1	5.4	1.2	-	-	-	+	-			M₅
12	7.15	0.02	0.3	0.0	0.3	0.1	0.6	0.1	-	+	-	-	-			Galactosilado
13	7.36	0.02	0.4	0.0	0.7	0.3	1.3	0.0	-	+	-	-	+			Galactosilado
14	7.62	0.02	53.3	0.8	22.6	2.5	25.7	0.1	-	-	+	-	+			A₂G₀F
15	7.99	0.02	0.2	0.0	0.9	0.3	0.7	0.0	-	+	+	-	-			A₂G₁(1,3)
16	8.13	0.02	1.5	0.0	0.9	0.0	0.8	0.0	-	-	+	-	+			A₂G₀FB
17	8.49	0.02	0.0	0.0	0.5	0.0	0.2	0.1	-	-	-	+	-			M₇
18	8.69	0.02	11.9	0.3	12.0	1.5	16.7	1.1	-	+	+	-	+			A₂G₁(1,6)F
19	9.03	0.02	13.0	0.3	15.4	1.2	18.7	0.7	-	+	+	-	+			A₂G₁(1,3)F
20	9.53	0.02	0.5	0.1	1.1	0.1	1.3	0.1	-	-	-	+	-			M₈
21	9.72	0.02	0.2	0.0	0.3	0.0	0.6	0.1	-	-	+	-	+			Complejo
22	10.11	0.02	3.2	0.2	14.0	1.1	9.8	0.4	-	+	-	-	+			A₂G₂F
23	10.33	0.02	0.4	0.1	2.4	0.2	1.6	0.2	-	-	-	+	-			M₉
24	11.12	0.03	0.5	0.0	1.1	0.1	1.7	0.1	-	+	-	-	-			Galactosilado
25	11.41	0.02	0.2	0.0	0.5	0.0	0.7	0.0	-	+	-	-	+			Galactosilado
26	12.38	0.02	0.2	0.0	1.0	0.3	1.3	0.0	-	-	-	-	+			?

s, desviación estándar de 6 muestras. Dif, diferencia del promedio entre dos muestras. Sial., Sialidasa. Gal., β-Galactosidasa. Hex., Hexosaminidasa. Man., α-Manosidasa. Fuc., Fucosidasa. “+” Digerido. “-” No digerido.

En la **Figura 28** se muestran las representaciones gráficas para 13 de los oligosacáridos más abundantes asociados a los AcM producidos. Los picos más abundantes (14, 18, 19 y 22) correspondieron a los oligosacáridos de tipo complejos G₀, G₁(1,6), G₁(1,3) y G₂, característicos de IgG, los cuales se determinó fueron fucosilados. Las estructuras de tipo alta manosa M₅, M₇, M₈ y M₉ (picos 11, 17, 20 y 23, respectivamente) también estuvieron presentes.

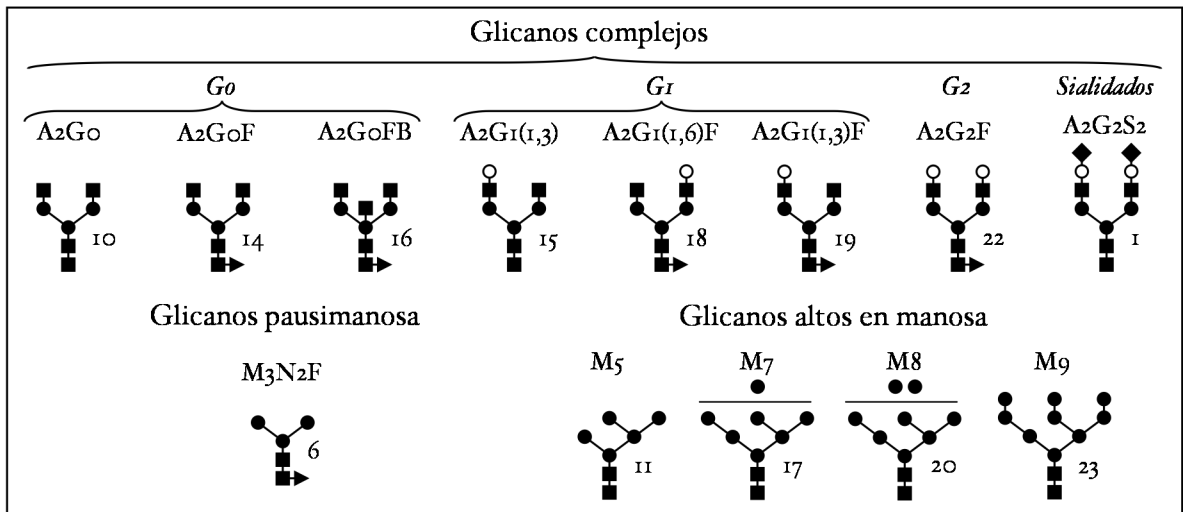


Figura 28. Estructuras de oligosacáridos y su correspondiente número de pico.

La abundancia relativa de los oligosacáridos presentes en el AcM producido en cada medio de cultivo, agrupados como de tipo paucimanosa, altos en manosa y oligosacáridos complejos se muestra en la [Figura 29](#).

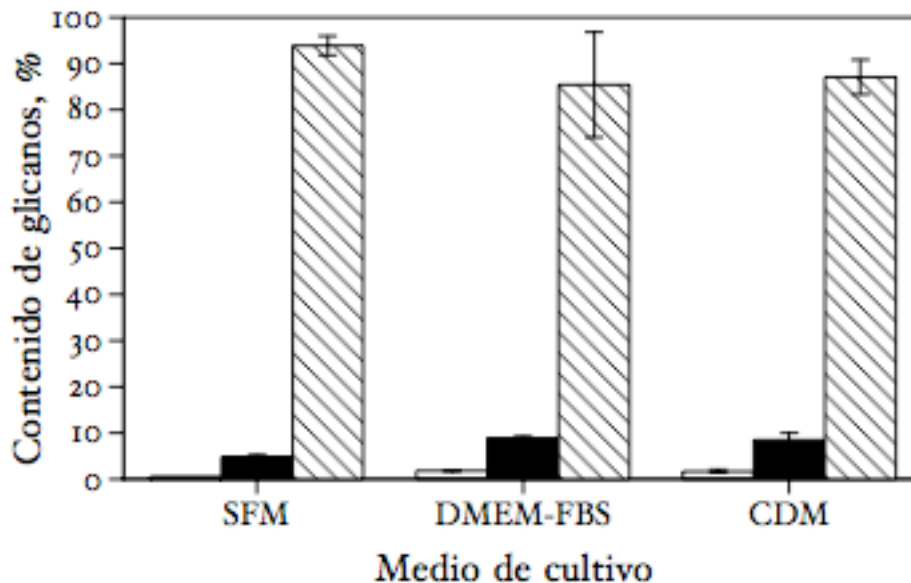


Figura 29. Porcentaje relativo de glicanos tipo pausimanosa (barra blanca), altos en manosa (barra negra) y complejos (barra con diagonales) en los tres medios de cultivo analizados. Las barras de error provienen de la diferencia entre dos cultivos independientes.

En cada uno de los tres medios de cultivo evaluados aproximadamente el 90 % de los oligosacáridos correspondió a estructuras complejas (comprendiendo sialidados, Go, G1, G2 y algunos glicanos complejos no identificados). Menos del 10 % correspondió a glicanos altos en manosa y menos del 2 % correspondió a estructuras de tipo paucimanosa (M3N2F).

Analizando el porcentaje relativo de los diferentes oligosacáridos de tipo complejo, las estructuras tipo Go y G1 fueron las más abundantes (Figura 30). Adicionalmente, la proporción de oligosacáridos tipo Go y G1 fue prácticamente igual en los medios CDM y DMEM-SFB. En dichos medios de cultivo el porcentaje relativo de oligosacáridos complejos sin galactosa terminal (Go) representó el 28 y 32 % del total de oligosacáridos respectivamente y el 42 y 46 % a estructuras galactosiladas (G1 más G2) respectivamente.

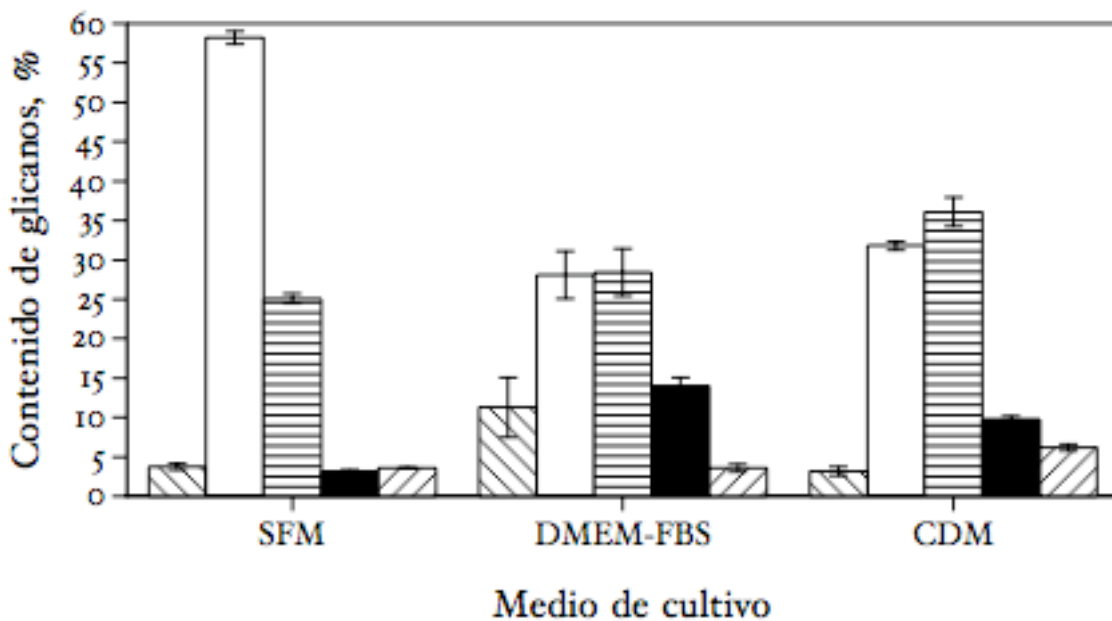


Figura 30. Composición de glicanos complejos. Porcentaje de sialidados (barra con diagonales), Go (barra blanca), G1 (barra líneas horizontales), G2 (barra negra) y no identificados (barra con diagonales inversas). El valor de las barra de error proviene de la diferencia entre dos cultivos independientes.

En contraste, una proporción muy alta de oligosacáridos tipo G₀, con aproximadamente el 58 % del total de oligosacáridos, fue determinada en el AcM producido en medio SFM, la cual se dió a expensas de estructuras de tipo G₁ y G₂. Con respecto al porcentaje relativo de estructuras tipo G₂, el medio DMEM-SFB mostró el mayor porcentaje (14 ± 1.1 %), seguido por los medios CDM (9.8 ± 0.4 %) y SFM (3.2 ± 0.2 %). Los oligosacáridos sialidados representaron el porcentaje de oligosacáridos complejos más bajo, siendo del 11.3 ± 3.8 %, 3.8 ± 0.4 % y 3.2 ± 0.6 % en los medios DMEM-SFB, SFM y CDM, respectivamente. El mayor porcentaje de estructuras sialidadas observado en el medio DMEM-SFB se debió principalmente a la presencia de tres estructuras sialidadas: los picos 2 y 3 detectados únicamente en el AcM producido con este medio de cultivo y a un mayor porcentaje del pico 1 en este medio, en comparación con los medios SFM y CDM. El medio DMEM-SFB mostró tener el porcentaje más bajo de oligosacáridos fucosiladas (69.3 ± 3.6 %), mientras que porcentajes más altos fueron observados en CDM y SFM (77.9 ± 2.2 % y 87.5 ± 0.1 %, respectivamente) (Tabla 8).

Con respecto al porcentaje de ocupación de los dos sitios potenciales de glicosilación del AcM, se determinó que estuvieron ocupados al 80 % aproximadamente, sin importar el medio de cultivo utilizado, véase Figura 31. Se debe tomar en cuenta que el AcM producido en este estudio carece de sitios potenciales de glicosilación en la región Fab (Selisko *et al.*, 1999), por lo que todos los glicanos analizados correspondieron a oligosacáridos presentes en la región Fc.

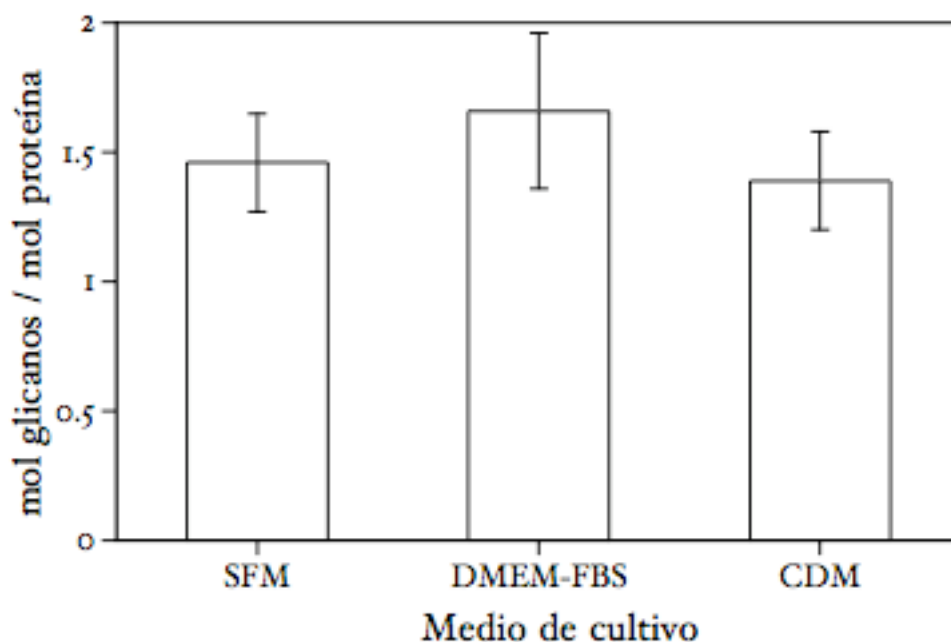


Figura 31. Percentage de ocupación de los sitios de glicosilación del AcM producido en medio SFM, DMEM-SFB y CDM. Los valores de las barrar de error provienen de la diferencia de los cultivos independientes.

Acorde con lo que se ha observado en reportes anteriores (Gorfien *et al.*, 1999 y 2000; Voigt y Zintl, 1999; Valdes *et al.*, 2001), la línea celular utilizada en este estudio alcanzó mayores concentraciones celulares y de AcM cuando fue cultivada en medios libres de suero (SFM y CDM), en comparación con el medio DMEM-SFB (Tabla 7). Además, los rendimientos celulares por glucosa y glutamina mas altos y más bajos de producción de lactato (mol de lactato producido por mol de glucosa consumida) se obtuvieron en los medios CDM y SFM. En contraste, la mayor acumulación, rendimiento (mol de lactato producido por mol de glucosa consumida) y velocidad específica de producción de lactato se obtuvieron en el medio DMEM-SFB, lo cual refleja una alta actividad glicolítica en este medio de cultivo. Tomando estos resultados de manera independiente, podrían resaltar la ventaja de utilizar medios mejorados libres de suero o químicamente definidos

en su totalidad, sobre los medios de cultivo tradicionales suplementados con SFB (Froud, 1999; Merten, 1999; Jayme y Smith, 2000; Even *et al.*, 2006). Sin embargo, como se observó, el medio de cultivo tuvo efectos importantes en el patrón de glicosilación y por lo tanto en la calidad del AcM producido. De acuerdo a lo anterior, la productividad del AcM no debe ser el único criterio para la selección del medio de cultivo, especialmente cuando se trata de producir una AcM con fines terapéuticos.

En este estudio, utilizamos EC para determinar el patrón de glicosilación de un AcM producido en tres medios de cultivo diferentes. La técnica de EC fue seleccionada por tener ciertas ventajas sobre los métodos comúnmente utilizados como HPLC o FACE (electroforesis capilar con anisotropía de fluorescencia). Primero, la EC es una potente herramienta analítica que puede rápidamente (en menos de 20 min) cuantificar oligosacáridos asociados a AcM en un intervalo de concentración nanomolar utilizando muy poca cantidad de muestra (en el orden de nanolitros). Sin embargo, la EC ha sido escasamente utilizada a la fecha para este propósito (Ma y Nashabeh, 1999; Raju *et al.*, 2000; Mechref *et al.*, 2005) y relativamente pocas estructuras de glicanos se encuentran reportadas en la literatura con este método. De acuerdo a lo anterior, las estructuras determinadas en este estudio contribuyen a expandir la base de datos de estructuras de glicanos relevantes resueltas por EC en términos de UG.

Veintiséis estructuras de oligosacáridos fueron identificadas y cuantificadas, incluyendo algunas que representaron menos del 0.2 % del contenido total de glicanos. Los glicanos ausentes en CDM y SFM comparados con DMEM-SFB, correspondieron a estructuras con un porcentaje relativo menor al 5 %. Es importante mencionar que la mayoría de los estudios de caracterización del patrón de glicosilación de AcM reportan muy pocas estructuras, en general solamente las de

mayor porcentaje son tomadas en cuenta. Por ejemplo, [Mechref et al.](#) utilizando EC reportó un total de 7 glicanos presentes en la región Fc de un AcM murino, mientras que [Ma y Nashabe \(1999\)](#) reportaron 4 estructuras de glicanos asociados a un AcM quimérico producido en células CHO. Por su parte, otros grupos han identificado menos de 5 estructuras mayoritarias de glicanos en diferentes AcM utilizando HPAEC-PAD (HPLC con detector de pulso amperométrico) o HPLC ([Saba et al., 2002](#); [Cabrera et al., 2005](#)). Como mostramos aquí, una caracterización detallada del patrón de glicosilación de AcM puede revelar una mayor microheterogeneidad que lo usualmente reportado. La cuantificación de glicofomas menos abundantes debe ser la regla y no la excepción, particularmente en el caso de AcM con fines terapéuticos. Recientemente se ha reportado que la presencia de oligosacáridos atípicos, tales como estructuras altas en manosa o híbridas, reducen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) ([Kanda et al., 2006](#)). La actividad biológica de un AcM está estrechamente relacionada con su patrón de glicosilación, en particular a su grado de sialidación, fucosilación, galactosilación y bisectación con GlcNAc ([Kanda et al., 2006](#)). Los cultivos en medio SFM y CDM tuvieron el contenido más bajo y la menor cantidad de estructuras sialidadas. Esto fue el resultado de una importante disminución en la estructura A₂G₂S₂ (pico 1) y a la ausencia de estructuras correspondientes a los picos 2 y 3. En general, el nivel de sialidación en IgG ha sido reportado por debajo del 20 % ([Jefferis, 2005](#)). Esta observación tiene implicaciones muy importantes, como fue determinado recientemente por [Kaneko et al. \(2006\)](#), quienes observaron que la sialidación reduce la capacidad citotóxica de la IgG. Si la función efectora de un AcM es necesaria o deseada, entonces la sialidación debe ser evitada. Un incremento en la fucosilación fue observado para los oligosacáridos del AcM producido en SFM y CDM

(aprox. 78 y 88 %, respectivamente) comparado con DMEM-SFB (aprox. 69 %). Recientemente se ha reportado también que la ADCC ha mostrado incrementos de más de 50 veces cuando el grado de fucosilación del anticuerpo se ha disminuido del 94 al 66 % (Shinkawa et al., 2003) o del 98 a 21 % (Shields et al., 2002), señalando la importancia de los efectos adversos que la fucosilación puede tener en AcM terapéuticos. El grado de galactosilación (estructuras G1 + G2) que se determinó fue similar en CDM y DMEM-SFB, 46 y 42 %, respectivamente. Tales valores son comparables con reportes previos en IgG humana (Routier et al., 1998). En contraste, el porcentaje de estructuras galactosiladas que se determinó, fue tan sólo del 28 % en el AcM producido en SFM y los oligosacáridos sin galactosa terminal se incrementaron a 58 %, un valor similar al reportado para IgG de pacientes con artritis reumatoide (Guile et al., 1997). El efecto de la presencia de oligosacáridos galactosilados en la función efectora del AcM no ha sido bien establecida. Por un lado, algunos autores no han encontrado efectos obvios de la degalactosilación del anticuerpo en la ADCC (Shinkawa et al., 2003), mientras que otros han reportado un efecto negativo significativo (Hodoniczky et al., 2005). Por otro lado, el alto contenido de estructuras de oligosacáridos de tipo Go en las IgG humanas está correlacionado con diferentes patologías (Parek et al., 1985), sobre todo de orden inflamatorio y las estructuras galactosiladas son las que predominan en individuos sanos. En vista de las evidencias anteriores, se puede inferir que, dependiendo del tipo de respuesta efectora deseada para un AcM con fines terapéuticos, se requerirá un patrón de glicosilación particular.

El patrón de glicosilación de un AcM puede ser afectado por la presencia de exoglicosidasas extracelulares, las cuales pueden depender del medio de cultivo utilizado. Sin embargo, existe escasa información al respecto. Como se determinó en este estudio, el SFB presentó altas actividades β -galactosidasa, β -N-acetilhexosaminidasa y α -manosidasa

las cuales estuvieron presentes desde el inicio de los cultivos en el medio DMEM-SFB. En particular la actividad β -N-acetilhexosaminidasa fue 10 veces superior ($843 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$) que las otras dos actividades enzimáticas medidas. Tales resultados resaltan los beneficios, entre otros, de eliminar el SFB. Las actividades exoglicosidasas determinadas en el presente estudio fueron del mismo orden de magnitud que las reportadas por **Gramer y Goochee (1994)** para hibridomas cultivados en un biorreactor air-lift de 22 L. Así, la actividad β -galactosidasa máxima obtenida en este estudio en los medios CDM y DMEM-SFB fue aproximadamente el doble que la observada por **Gramer y Goochee (1994)** y 6.8 veces mayor cuando se utilizó SFM. De la misma manera, la actividad de β -N-acetilhexosaminidasa medida en SFM y CDM fue aprox. 2.5 y 1.5 veces menor, respectivamente y 1.4 más alta en DMEM-SFB que los valores reportados por **Gramer y Goochee (1994)**. La máxima actividad β -N-acetilhexosaminidasa en el medio DMEM-SFB fue resultado de la actividad enzimática inicial presente en el SFB, más que de su acumulación durante el cultivo. En SFM, donde la mayor actividad β -galactosidasa fue determinada, más del 50 % de oligosacáridos correspondió a estructuras de tipo G₀, mientras que las estructuras de tipo G₁ y G₂ (sustratos para la β -galactosidasa que produce estructuras de tipo G₀) representó sólo el 28 %, sugiriendo un efecto de degradación por la presencia de esta enzima en el medio de cultivo. **Hill et al. (2001)** observaron un efecto de degalactosilación en una IgG producida en células NS0 en cultivo por lote de 3 L. Los autores atribuyeron tales cambios a la presencia de proteasas y glicosidasas liberadas por las células lisadas. Por otro lado, **Cabrera et al. (2005)** propusieron que la presencia de enzimas exoglicosidasas fueron las responsables de las modificación del patrón de galactosilación de un AcM de tipo IgG_{2b}, aunque no determinaron la actividad enzimática.

Debe tomarse en cuenta que la glicosilación de proteínas es un proceso muy complejo, donde además de las actividades exoglicosidasas extracelulares, muchos otros factores como la reducida actividad galactosiltransferasa o la limitación de UDP-galactosa, pudieron ser también los responsables del bajo nivel de galactosilación observado en SFM. Con respecto a la alta actividad β -N-acetilhexosaminidasa determinada en los cultivos con DMEM-SFB, no se observaron diferencias en el patrón de glicosilación que hubiesen indicado un efecto degradativo. Finalmente, la ausencia de la estructura alta en manosa M6 en los tres medios de cultivo puede sugerir una actividad degradativa por parte de la enzima α -manosidasa extracelular.

II. CONCLUSIONES

En el presente proyecto se realizó una evaluación de los efectos que variables de cultivo como el OD, pH y dCO_2 en valores constantes y oscilantes ejercen sobre el crecimiento y metabolismo de un hibridoma murino modelo y sobre la producción y patrón de N-glicosilación del AcM producido. Para tal efecto se implementó un sistema de cultivo específico para células animales en el que se simularon bajo condiciones controladas, gradientes específicos de OD, dCO_2 y pH. Se logró determinar y/o predecir los efectos de tales condiciones de heterogeneidad sin la necesidad de realizar experimentación en biorreactores de gran escala.

Se evaluó el efecto de los gradientes de OD sobre el patrón de N-glicosilación del AcM. Un incremento en el porcentaje de los oligosacáridos sialidados y galactosilados triantenarios a expensas de estructuras de tipo G_0 y G_1 se observó cuando el periodo de oscilación se incrementó por arriba de 6400 s. Estos resultados mostraron que las condiciones de heterogeneidad de OD (que ocurren o podrían ocurrir cuando no se establecen procesos adecuados de escalamiento y operación) no solamente tienen efectos en el crecimiento y metabolismo celular, sino que también afectan la estructura del AcM a un nivel tan exquisito como lo es su patrón de N-glicosilación.

Se determinó el efecto del pH y dCO_2 tanto constante como oscilante sobre el crecimiento y metabolismo del hibridoma modelo y sobre la producción y patrón de N-glicosilación del AcM producido. Se mostró que los cultivos a concentración de dCO_2 fisiológico de 50 mbar favorecieron el crecimiento celular alcanzándose altas concentraciones celulares y un mejor aprovechamiento de las fuentes de carbono y energía. Sin embargo, fue en los cultivos bajo condiciones de hipocapnia e

hipercapnia donde se favoreció la producción de AcM. Se determinó que las condiciones óptimas de dCO_2 y pH para crecimiento celular y producción de AcM son diferentes, las que promovieron el crecimiento celular afectaron la producción de AcM y viceversa. Con respecto a los cultivos llevados a cabo a dCO_2 y pH oscilantes se determinó un efecto negativo en el crecimiento, metabolismo celular y producción de AcM a medida que se incrementó el periodo de oscilación. Sin embargo, las concentraciones de AcM alcanzadas bajo condiciones oscilatorias fueron mayores que las obtenidas bajo condiciones constantes. Los resultados anteriores mostraron que las condiciones de cultivo heterogéneas también tienen efectos positivos, p eg. en la producción de AcM como se determinó en el presente estudio. Con respecto al patrón de N-glicosilación del AcM producido se determinó un menor número de estructuras de glicano en los cultivos a 50 mbar y a 1800 s de periodo de oscilación. Además, en los cultivos a dCO_2 fisiológico de 50 mbar se determinó un incremento en el porcentaje relativo de estructuras sialidadas a expensas de estructuras de tipo Go. Los resultados anteriores mostraron que las condiciones de cultivo adversas y/o heterogéneas alteraron el proceso de glicosilación del AcM dando como resultado un patrón de N-glicosilación más heterogéneo y menos procesado.

Cuando se determinó el efecto del uso de diferentes tipos de medios de cultivo sobre el crecimiento y metabolismo del hibridoma modelo y sobre la producción y patrón de N-glicosilación del AcM producido, se demostró que el medio de cultivo no sólo tiene un impacto fundamental en el crecimiento celular y la producción de AcM, sino que además influye importantemente e incluso puede determinar el patrón de N-glicosilación del AcM. Se demostró además que los cambios observados en el patrón de N-glicosilación del AcM pueden ser ocasionados por la actividad de enzimas exoglicosidasas extracelulares. Las diferencias en el patrón de N-glicosilación de un

AcM ocasionadas por el uso de un medio de cultivo en particular puede tener repercusiones directas importantes en su función efectora, lo que enfatiza la importancia en el diseño y selección del medio de cultivo cuando se desea mejorar la producción de AcM.

El patrón de N-glicosilación del AcM producido fue determinado por dos métodos analíticos: HPLC de fase normal y electroforesis capilar de carbohidratos. Se demostró que ambos métodos analíticos resultaron ser efectivos, poderosos y comparables para la determinación y cuantificación del patrón de N-glicosilación del AcM, con una alta resolución y el uso de relativamente pequeñas cantidades de muestra. La EC mostró la ventaja de realizar el análisis en aprox. 1/10 del tiempo requerido mediante HPLC.

12. REFERENCIAS

- Abu-Absi N. y Srienc F. (1999) Cell cycle, eukaryotes. In: Flickinger M. y Drew S., editors. *Encyclopedia of bioprocess technology. Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. New York: John Wiley & Sons. pp. 476-492.
- Aguilar-Aguila A., Valentinotti S., Galindo E. y Ramírez O. T. (1993) Desarrollo de un sistema amigable y versátil para adquisición de datos y control de biorreactores. *Biotecnología* **3**:S130-S139.
- Alkan S. S. (2004) Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nature Reviews Immunology* **4**:153-156.
- Al-Rubeai M., Singh R. P., Goldman M. H. y Emery A. N. (1995) Death Mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnology and Bioengineering* **45**:463-472.
- Andersen D. C. y Goochee Ch. F. (1994) The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins. *Current Opinion in Biotechnology* **5**:546-549.
- Arnold J. N., Wormald M. R., Sim R. B., Rudd P. M. y Dwek R. A. (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology* **25**:21-50.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Cabrera G., Cremata J., Valdés R., García R., González Y., Montesino R., Gómez H. y González M. (2005) Influence of culture conditions on the N-glycosylation of a monoclonal antibody specific for recombinant hepatitis B surface antigen. *Biotechnology Applied Biochemistry* **41**:67-76.
- Charles M. (1985) Fermentation scale-up: problems and possibilities. *Trends in Biotechnology* **3**:134-139.
- Chisti Y. (2000) Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends in Biotechnology* **18**:420-432.

- Cherlet M. y Marc A. (2000) Stimulation of monoclonal antibody production of hybridoma cells by butyrate: evaluation of a feeding strategy and characterization of cell behaviour. *Cytotechnology* **32**:17-29.
- Clark M. R. (1997) IgG Effector Mechanisms. *Chemical Immunology* **65**:88-110.
- Csirke B., Godwin G. y Gorfien S. (1999) Cloning hybridoma cells in a protein-free, chemically defined hybridoma medium. *FOCUS* **21**:33-34.
- deZengotita V., Kimura R. y Miller W. (1998) Effects of CO₂ and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production. *Cytotechnology* **28**:213-227.
- deZengotita V. M., Schmelzer A. E. y Miller W. M. (2002a) Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO₂ and osmolality: intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* **77**:369-380.
- deZengotita V. M., Abston L. R., Schmelzer A. E., Shaw S. y Miller W. M. (2002). Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality. *Biotechnology and Bioengineering* **78**:741-752.
- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. (2007). http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6
- Doran P. M. (1993) Design of reactors for plant cells and organs, In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Fiechter A. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin. Vol.48 pp. 115-168.
- Ehrlich P. (1900) Croonian lecture: On immunity with special reference to cell life. *Proceedings of The Royal Society of London* **66**:424-448.
- Elias C. B., Zeiser A., Bédard Ch. y Kamen A. A. (2000) Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of 5.2×10^7 cells per mL and production of β -galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnology and Bioengineering* **68**:381-388.
- Estrada-Mondaca S., Delgado-Bustos L. y Ramírez O. T. 2005. "Mannosamine supplementation extends N-acetylglucosaminylation of r-human-SeAP produced by *Trichoplusia ni* insect cell culture". *Biotechnology Applied Biochemistry* **42**:25-34.

- Even M., Sandusky Ch. y Barnard N. (2006) Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnology* **24**:105-108.
- Farid S. S. (2006) Established bioprocesses for producing antibodies as a basis for future planning. In: Hu W.-S. (volume ed) *Cell culture engineering. Advances in biochemical engineering/biotechnology series*. No. 101. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-42.
- Freshney R. I. (2005) Culture of animal cells, A manual of basic technique. Chap. 9, *Defined media and supplements*, Wiley-Liss, pp. 115-128.
- Freshney R. I. (1983) Culture of animal cells, A manual of basic technique. Chap. 19, *Quantitation and experimental desing*, Alan R. Liss, Inc., pp. 199-202.
- Froud, S. (1999) The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Developmental Biological Standarization* **99**:157-166.
- Garnier A., Voyer R., Tom R., Perret S., Jardin B. y Kamen A. (1996) Dissolved carbon dioxide accumulation in a large scale and high density production of TGF β receptor with baculovirus infected Sf-9 cells. *Cytotechnology* **22**:53-65.
- Glennie M. J. y Johnson P. W. M. (2000) Clinical trials of antibody therapy. *Immunology Today* **21**:403-410.
- Glyko Inc. (2001-2002) Glycoconjugate Analysis. In: Tools for Glycobiology. USA, pp. 2.2-2.42.
- GlycoBase NIBRT (<http://glycobase.ucd.ie/cgi-bin/public/glycobase.cgi>)
- Goding J. W. (1986) Monoclonal antibodies: Principles and practice. Orlando: Academic Press. pp. 5-58.
- Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A. y Kuby J. (2003) *Immunology*. W.H. Freeman & CO., New York, pp. 76-104.
- Goochee Ch. F. y Monica T. (1990) Environmental effects on protein glycosylation. *Bio/Technology* **8**:421-427.
- Goochee C., Gramer M., Andersen D., Bahr J. y Rasmussen J. (1991) The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Bio/Technology* **9**:1348-1355.

- Gorfien S., Godwin G., Samrock R. y Tilking M. (1999) Hybridoma growth and antibody production in a protein-free, chemically defined medium. *FOCUS* **21**:30-32.
- Gorfien S., Paul B., Walowitz J., Keem R., Biddle W. y Jayme D. (2000) Growth of NS0 cells in protein-free, chemically defined medium. *Biotechnology Progress* **16**:682-687.
- Gramer M. J. y Goochee C. F. (1993) Glycosidase activities in chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnology Progress* **9**:366-373.
- Gramer M. J. y Goochee C. F. (1994) Glycosidase activities of the 293 and NS0 cell lines, and of an antibody-producing hybridoma cell line. *Biotechnology and Bioengineering* **43**:423-428.
- Gray D. R., Su Ch., Howarth W., Inlow D. y Maiorella B. L. (1996) CO₂ in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture. *Cytotechnology* **22**:65-78.
- Guile G. R., Rudd P. M., Wing D. R., Prime S. B. y Dwek R. A. (1996) A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Analytical Biochemistry* **240**:210-226.
- Guile G., Rudd P., Wing D. y Dwek, A. (1997) HPLC strategies for profiling and sequencing oligosaccharides. In *BioMethods* Vol. 9 A laboratory guide to glycoconjugate analysis. Jackson, P. and Gallagher, J. Eds. Ed. Berlin. pp. 199-233.
- Ghirlando R., Lund J., Goodall M. y Jefferis R. (1999) Glycosylation of human IgG-Fc: influences on structure revealed by differential scanning micro-calorimetry. *Immunology Letters* **68**:47-52.
- Guttman A. (1997) Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. **763**:271-77.
- Hevehan D. L. y Miller W. M. (1999) Hypoxia, effects on animal cells. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, New York: John Wiley & Sons. pp. 1418-1433.
- Hills A., Patel A., Boyd P. y James D. (1999) Control of therapeutic monoclonal antibody glycosylation. In: Bernard, A., Griffiths, B.,

- Noé, W. and Wurm, F. (Eds.), *Animal cell technology: Products from cells, cells as products*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 255-257.
- Hills A., Patel A., Boyd P. y James D. (2001) Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnology and Bioengineering* **75**:239-251.
- Hodoniczky J., Zheng Y. Z. y James, D. C. (2005) Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnology Progress* **21**:1644-1652.
- Hwang Ch. y Sinskey A. J. (1991) The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. In: *Production of Biologicals from Animal Cells in Culture*, Spier R.E., Griffiths J.B. y Meignier A. (Eds.), B. Halley Court, Oxford, pp. 548-567.
- Jassal R., Jenkins N., Charlwood J., Camilleri P., Jefferis R. y Lund J. (2001) Sialylation of human IgG-Fc carbohydrate by transfected rat α 2,6-sialyltransferase. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **286**:243-249.
- Jefferis R. (2005) Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress* **21**:11-16.
- Jefferis R. y Lund J. (1997) Glycosylation of antibody molecules: structural and functional significance. In: Capra, J. D. (Ed.), *Antibody Engineering. Chemical Immunology* Karger, Basel, **65**:111-128.
- Jayme D. y Smith S. (2000) Media formulation options and manufacturing process controls to safeguards against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture. *Cytotechnology* **33**:27-36.
- Jöbses I., Martens D. y Tramper J. (1991) Lethal events during gas sparging in animal cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* **37**:484-490.
- Kanda Y., Yamada T., Mori K., Okazaki A., Inoue M., Kitajima-Miyama K., Kuni-Kamochi R., Nakano R., Yano K., Kakita S., Shitara K. y Satoh M. (2006) Comparison of biological activity among non-fucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* **17**:104-118.

- Kaneko Y., Nimmerjahn F. y Ravetch J. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* **313**:670-673.
- Kimura R. y 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**:152-160.
- Kiss R., Croughan M., Trask J., Polastri G., Groenhout M., Banka A., Shurin S., Paul J. y Koning-Bastiaan H. (1994) Mixing time characterization in large scale mammalian cell bioreactors. Paper presented at AIChE Annual Meeting, November de 1994, San Francisco, Cal., U.S.A.
- Köhler G. y Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.
- Kornfeld R. y Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagines-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* **54**:631-664.
- Kunkel J. P., Jan D. C. H., Jamieson J. C. y Butler M. (1998) Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affect N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology* **62**:55-71.
- Langheinrich C., Nienow A. W., Eddleston T., Stevenson N. C., Emery A. N., Clayton T. M. y Slater N. K. H. (1998) Liquid homogenization studies in animal cell bioreactors of up to 8m³ in volume. *Transactions In Chemical Engineering (Part C)* **76**:107-116.
- Langheinrich C. y Nienow A. W. (1999) Control of pH in large-scale, free suspension animal cell bioreactors: Alkaly addition and pH excursions. *Biotechnology and Bioengineering* **66**:171-179.
- Lara A. R., Galindo E., Ramírez O. T. y Palomares L. A. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors. Understanding the effects of environmental gradients on cells. *Molecular Biotechnology* **34**:355-381.
- Lidén G. 2002. Understanding the bioreactor. *Bioprocess Biosystem Engineering* **24**:273-279.
- Lifely M., Hale C., Boyce S., Keen M. y Phillips J. (1995) Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology* **5**:813-822.

- Lloid D. y Al-Rubeai M. (1999) Cell cycle. In: Flickinger M. y Drew S., editors. *Encyclopedia of bioprocess technology. Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. New York: John Wiley & Sons. pp. 465-476.
- Lodish H., Berk A., Zipurski S. L., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J.E. (2000) *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman & CO., New York, pp. 618-664.
- Luan Y. T., Mutharasan R. y Magee W. E. (1987) Strategies to extend longevity of hybridomas in culture and promote yield of monoclonal antibodies. *Biotechnology Letters* **9**:691-696.
- Lund J., Takahashi N., Nakagawa H., Goodall M., Bentley T., Hindley S., Tyler R. y Jefferis R. (1993) Control of IgG/Fc glycosylation: a comparison of oligosaccharides from chimeric human/mouse and mouse subclass immunoglobulin Gs. *Molecular Immunology* **30**:741-748.
- Ma S. y Nashabeh W. (1999) Carbohydrate analysis of a chimeric recombinant monoclonal antibody by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* **71**:5185-5192.
- Maggon K. (2007) Monoclonal antibody "Gold rush". *Current Medicinal Chemistry* **14**(18):1978-1987.
- Manfredini R., Caballera V., Marini L. y Donati G. (1983) Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors. *Biotechnology and Bioengineering* **25**:3115-3131.
- Marino M., Corti A., Ippolito A., Cassani G. y Fassina G. (1997) Effect of bench-scale culture conditions on murine IgG heterogeneity. *Biotechnology and Bioengineering* **54**:17-25.
- Mattu T. S., Pleass R. J., Willis A. C., Kilian M., Wormald M. R., Lellouch A. C., Rudd P. M., Woof J. M. y Dwek R. A. (1998) The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions. *Journal Biological Chemistry* **273**:2260-2272.
- Mechref Y., Muzikar J. y Novotny M. (2005) Comprehensive assessment of N-glycans derived from a murine monoclonal antibody: A case for multimethodological approach. *Electrophoresis* **26**:2034-2064.
- Merten O. (1999) Safety issues of animal products used in serum-free media. *Developmental Biological Standardization* **99**:167-180.

- Merten O. (2006) Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. *Cytotechnology* **50**:1-7.
- Michaels D. J., Mallik K. A. y Papoutsakis E. T. (1996). Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: Do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? *Biotechnology and Bioengineering* **51**:399-409.
- Miller W. M. y Blanch H. W. (1991) Regulation of animal cell metabolism in bioreactors, In: *Animal cell bioreactors*, Ho C. S. and Wang D. I. C. (Eds.), Butterworth-Heinemann, MA, pp. 119-159.
- Mostafa S. S. y Gu X. S. (2003) Strategies for improved dCO₂ removal in large-scale fed-batch cultures. *Biotechnology Progress* **19**:45-51.
- Nienow A. W., Langheinrich Ch., Stevenson N. C., Emery A. N., Clayton T. M. y Slater N. K. H. (1996) Homogenization and oxygen transfer rates in large agitated and sparged animal cell bioreactors: Some implications for growth and production. *Cytotechnology* **22**:87-94.
- Nienow A. W. (2006) Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology* **50**:9-33.
- Nose M. y Wigzell H. (1983) Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **80**:6632-6636.
- Oh S. K. W., Nienow A. W., Al-Rubeai M. and Emery A. N. (1992). Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. *Journal of Biotechnology* **22**:245-270.
- Oldshue J. Y. (1966) Fermentation mixing scale-up techniques. *Biotechnology and Bioengineering* **8**:3-24.
- Oosterhuis N. M. G. (1984) Scale-up of bioreactors, a scale-down approach. *Ph.D. Thesis*, Delft University of Technology, The Netherlands.
- Oosterhuis N. M. G. y Kossen N. W. F. (1984) Dissolved oxygen concentration profiles in a production-scale bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* **26**:546-550.

- Ozturk S. S. y Palsson B. O. (1990) Effect of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotechnology Progress* **6**:437-446.
- Ozturk S. S. y Palsson B. O. (1991) Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnology Progress* **7**:481-494.
- Ozturk S. S. (1996). Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnology* **22**:3-16.
- Ozturk S. S. (2006) Cell culture technology-An overview. In: Ozturk S. S. and Hu W. -S. (eds) *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 1-14.
- Palomares L. A., Joosten C. E., Hughes P. R., Granados R. R. y Shuler M. L. (2003) Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnology Progress* **19**: 185-192.
- Palomares L. A, Estrada-Mondaca S. y Ramírez O. T. (2004) Production of recombinant proteins: Challenges and solutions. In: Balbás, P. y Lorence A. editors. *Recombinant gene expression protocols*. Totowa: Humana Press. pp. 15-51.
- Palomares L. A. y Ramírez O. T. (2000) Bioreactor scale-down. In: Spier RE, editor. *Encyclopedia of cell technology*. New York: John Wiley & Sons. pp. 174-183.
- Parek R. B., Dwek R. A., Sutton B. J., Fernandes D. L., Leung A., Stanworth D., Rademacher T. W., Mizuochi T., Taniguchi T. y Matsuta K., (1985) Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* **316**:452-457.
- Patel T. P., Parekh R. B., Moellering B. J. y Prior Ch. P. (1992) Different culture methods lead to differences in glycosylation of a murine IgG monoclonal antibody. *Biochemistry Journal* **285**:839-845.
- Ramírez O. T. y Mutharasan R. (1990) Cell cycle-and growth phase-dependent variation in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma culture. *Biotechnology and Bioengineering* **36**:839-848.

- Ramírez O. T. y Mutharasan R. (1990b) The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnology and Bioengineering* **36**:911-920.
- Raju T., Briggs J., Borge S. y Jones, A. (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* **10**:477-486.
- Reichert J. y Pavlou A. (2004) Monoclonal Antibodies Market. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**:383-384.
- Riley S. (2006) The Future of Monoclonal Antibody Therapeutics: Innovation in antibody engineering, key growth strategies and forecast to 2011. Management Report. Business Insights Ltd. London, UK. pp. 180.
- Routier F. H., Hounsell E. F., Rudd P. M., Takahashi N., Bond A., Hay F. C., Alavi A., Axford J. S. y Jefferis R. (1998) Quantitation of the oligosaccharides of human serum IgG from patients with rheumatoid arthritis: a critical evaluation of different methods. *Journal Immunology Methods* **213**:113-130.
- Saba J., Kunkel J., Jan D. Ens W., Standing K., Butler M., Jamieson J. y Perrault H. (2002) A study of immunoglobulin G glycosylation in monoclonal and polyclonal species by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **305**:16-31.
- Sauer P. W., Burky J. E., Wesson M. C., Sternard H. D. y Qu L. (2000) A high-yielding generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnology and Bioengineering* **67**:585-597.
- Schmelzer A. E. y Miller W. M. (2002a) Effects of osmoprotectant compounds on NCAM polysialylation under hyperosmotic stress and elevated pCO₂. *Biotechnology and Bioengineering* **77**:359-368.
- Schmelzer A. E. y Miller W. M. (2002b) Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. *Biotechnology Progress* **18**:346-353.
- Schügerl K. (1993) Comparison of different bioreactor performances. *Bioprocess Engineering* **9**:215-223.
- Selisko B., Licea A., Becerril B., Zamudio F., Possani L. y Horjales E. (1999) Antibody BCF₂ against scorpion toxin Cn₂ from

- Centruroides noxius* Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Proteins* **37**:130-143.
- Serrato J. A. (2002) Estudio de escalamiento descendente del proceso de producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas. *Tesis de Maestría*, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Serrato J. A., Hernández V., Estrada-Mondaca S., Palomares L. A. y Ramírez O. T. (2007) Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnology Applied Biochemistry* **47**:113-124.
- Shields R. L., Lai J., Keck R., O'Connell L. Y., Hong K., Meng Y. G., Weikert S. H. A. y Presta L. G. (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal Biological Chemistry* **277**:26733-26740.
- Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N. y Shitara K. (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal Biological Chemistry* **278**:3466-3473.
- Takahashi N. y Tomiya N. (1992) Analysis of N-linked oligosaccharides: application of glycoamidase A. In: Takahashi N, Miramatsu T, editors. *Handbook of endoglycosidases and glycoamidases*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 199-332.
- Takuma S., Hirashima C. y Piret J. M. (2007) Dependence on glucose limitation of the pCO₂ influences on CHO cell growth, metabolism and IgG production. *Biotechnology and Bioengineering* **97**:1479-1488.
- Tramper J., Vlaskovits J. M. y De Gooijer C. D. (1996) Oxygen gradients in small and big sparged insect-cell bioreactors. *Cytotechnology* **20**:231-238.
- Valdés R., Ibarra N., González M., Alvarez T., García J., Llambias R. y Pérez A. (2001) CB.Hep-1 hybridoma growth and antibody production using protein-free medium in a hollow fiber bioreactor. *Cytotechnology* **35**:145-154.

- Varley J. y Birch J. (1999) Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology* **29**:177-205.
- Voigt A. y Zintl F. (1999) Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *Biotechnology Journal* **68**:213-226.
- Wayte J., Boraston R., Bland H., Varley J. y Brown M. (1997) pH: Effects on growth and productivity of cell lines producing monoclonal antibodies: control in large-scale fermenters. *The Genetic Engineer and Biotechnologist* **17**:125-132.
- Wright A. y Morrison S. L. (1997) Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends in Biotechnology* **15**:26-32.
- Xiao Ch., Huang Z., Li W., Hu X., Qu W., Gao L. y Liu G. (1999) High density and scale-up cultivation of recombinant CHO cell line and hybridomas with porous microcarrier Cytopore. *Cytotechnology* **30**:143-147.
- Yang J-D., Angelillo Y., Chaudhry M., Goldenberg C. y Goldenberg D.M. (2000) Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor Process. *Biotechnology and Bioengineering* **69**:74-82.
- Yoon S. K., Ahn Y. H. y Han K. (2001) Enhancement of recombinant erythropoietin production in CHO cells in an incubator without CO₂ addition. *Cytotechnology* **37**:119-132.
- Zamudio F., Saavedra R., Martin B. M., Gurrola-Briones G., Herion P. y Possani L. D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. Journal Biochemistry* **204**:281-292.
- Zanghi J. A., Schmelzer A. E., Mendoza T. P., Knop R. H. y Miller W. (1999) Bicarbonate concentration and osmolarity are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO₂ or pH. *Biotechnology and Bioengineering* **65**:182-191.
- Zhu M. M., Goyal A., Rank D. L., Gupta S. K., Boom T. V. y Lee S. S. (2005) Effects of elevated pCO₂ and growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: A case study. *Biotechnology Progress* **21**:70-71.

13. ANEXOS

13.1 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE N-GLICOSILACIÓN DEL ACM PRODUCIDO POR CULTIVO *IN VIVO* DEL HIBRIDOMA BCF₂

Se realizó el análisis del patrón de N-glicosilación del AcM producido por cultivo del hibridoma BCF₂ *in vivo* y se comparó con el producido por cultivo en biorreactor. El análisis fue realizado utilizando la metodología cromatográfica por HPLC de fase normal.

En la Figura A1 se muestran los perfiles cromatográficos del patrón de N-glicosilación del AcM producido en ambas condiciones.

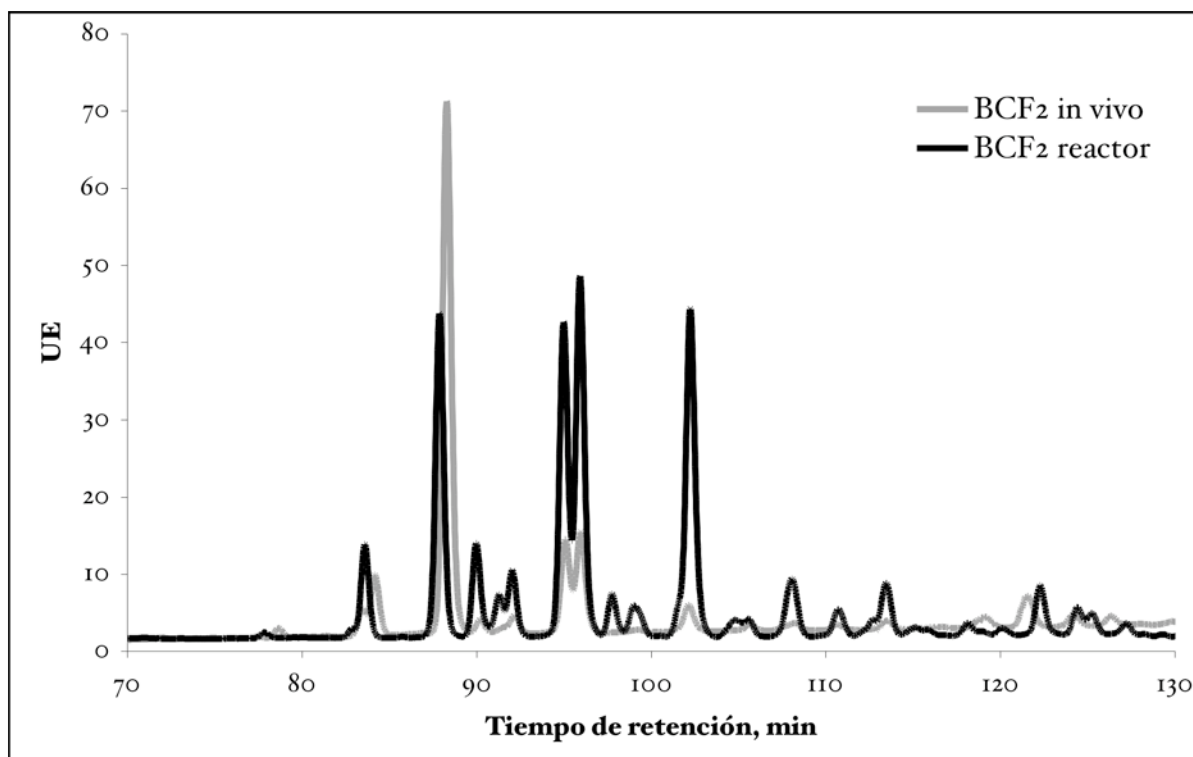


Figura A1. Cromatogramas comparativos del patrón de glicosilación del AcM BCF₂ producido por cultivo de hibridomas *in vivo* y en biorreactor.

En la Tabla A1 se muestra el listado de los picos identificados, las estructura propuestas correspondientes basándose en las UG a que eluyó cada pico y su porcentaje relativo de aparición.

Tabla A1. Identificación y cuantificación de los picos resueltos en el análisis por HPLC-Fase Normal del patrón de N-glicosilación del AcM producido en cultivo *in vivo* y en reactor.

Pico	UG	Estructura propuesta	BCF ₂ <i>in vivo</i> (%)	BCF ₂ reactor (%)
	1.71	maltosa		
1	4.49	N ₂ M ₃	0.25	0.00
2	5.06	N ₂ FM ₃	1.06	0.21
3	5.53	M ₄	5.49	0.00
4	5.59	A₂G₀	5.63	4.20
5	6.01	A₂G₀F(6)	50.94	15.16
6	6.23	M ₄ FN	1.26	4.53
7	6.38	M ₅	0.99	2.06
8	6.46	A ₂ G ₁ (6)	2.03	3.14
9	6.79	A₂G₁(6)F(6)	9.52	14.89
10	6.90	A₂G₁(3)F(6)	10.83	17.47
11	7.12	M ₆	0.00	2.01
12	7.28	A ₂ G ₂	0.00	2.07
13	7.62	A ₂ G ₁ S ₁	0.00	0.99
14	7.69	A₂G₂F	3.29	16.71
15	8.04	A ₂ FG ₂ S ₁	0.00	1.06
16	8.14	M ₆	0.77	0.94
17	8.50	A ₂ FG ₂ S ₂	0.00	3.76
18	8.63	A ₂ G ₂ S ₂	0.97	0.00
19	8.90	A ₃ G ₃ S ₁	0.00	1.44
20	9.22	A ₃ G ₃ S ₂	0.60	0.67
21	9.34	A ₃ FG ₃ S ₁	0.00	2.90
22	9.61	M ₉	0.24	0.35
23	10.26	A ₃ G ₃ S ₃	1.42	0.00
24	10.64	A ₃ FG ₃ S ₂	3.44	0.00
25	10.88	A ₄ FBFG ₃	0.00	2.74
26	11.06	A ₃ F ₂ G ₃ S ₁	1.27	0.00
27	11.30	A ₄ G ₄ S ₄	0.00	1.45
28	11.46	A ₄ F ₂ G ₃	0.00	1.24

En la Tabla A2 se muestra el porcentaje relativo de aparición de las estructuras de glicanos de acuerdo con los principales grupos de oligosacáridos.

Tabla A2. Abundancia relativa de los principales grupos de oligosacáridos presentes en el AcM producido por cultivo *in vivo* y en reactor.

Grupo de glicanos	Abundancia relativa, % <i>in vivo</i>	Abundancia relativa, % reactor
Pausimanosa	2.6	4.7
Altos en manosa	7.5	5.4
G0	56.6	19.4
G1	22.4	36.5
G2	4.3	23.6
G3	6.7	9.0
G4	0.0	1.4
Sialidados	6.7	12.3
Fucosilados	81.6	80.5

13.2 PROGRAMA DE COMPUTADORA DEL SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICIÓN DE DATOS DEL SISTEMA DE CULTIVO:

PROGRAMA I: PROGRAMA DE CONTROL PARA CULTIVOS A OD, pH Y DCO₂ EN VALORES CONSTANTES.

```
START:
  LIBRARY "411DRIVERS INTERFACE"
  LIBRARY "DATAMANIPULATION INTERFACE"
  CALL MAINIT
  CALL MSINIT (4,1,499,1)
  CALL DOUT (0,63)
  DIM ENT%(7): DIM ENT!(7)
  CLS
  MENU 2,0,1,"":MENU OFF
  MENU 1,0,1,"INTERACTUAR"
  MENU 1,1,1,"CAMBIAR PARAMETROS":CMDKEY
1,1,"P"
  MENU 1,2,1,"DETENER ":CMDKEY 1,2,"D"
  MENU 1,3,1,"REINICIAR":CMDKEY 1,3,"R"
  MENU 1,4,1,"TERMINAR":CMDKEY 1,4,"T"
  ON MENU GOSUB INTERAC: MENU ON
' GOTO BYPASS

PRINC:
  WINDOW 2,"PARAMETROS", (0,40)-(510,380),1
  INPUT "Nombre del Archivo (no repetir nombre ya
usado)": ARCHIVOS : PRINT
  INPUT "Intervalo de Adquisición de Datos (seg)":TI% :
PRINT
  INPUT "Tiempo de la Fermentación (Hrs.):":TFH%:
PRINT
  INPUT "Flujo Total de Gases de Entrada en ccpm (no
exceder de 1000)": FG% : PRINT

  PRINT "Composición Inicial de los Gases de Entrada"
  INPUT "% N2 (sugerido:74.26%)": N2I
  IF N2I=0 THEN N2I=74.26:PRINT N2I
  INPUT "% O2 (sugerido:19.74%)": O2I
  IF O2I=0 THEN O2I=19.74:PRINT O2I
  INPUT "% CO2 (sugerido: 6.0%)(10% máximo si flujo
total es 1000)": CO2I: PRINT
  IF CO2I=0 THEN CO2I=6:PRINT CO2I

  INPUT "% de Oxígeno Disuelto Deseado": SDO! :
PRINT
  INPUT "Banda de Tolerancia para Oxígeno Disuelto
(+/- DO)":TOLDO : PRINT
  INPUT "Ganancia para control de Oxígeno Disuelto (-1 para
suprimir control)":GAINDO : PRINT
  INPUT "Tiempo de Control para O2 (seg)":
TCONTRLDO! : PRINT

  INPUT "CO2 Disuelto Deseado (en mbar)":SPCO2D!:
PRINT
  INPUT "Banda de Tolerancia para control de CO2
Disuelto (+/- pH)":TOLCO2D : PRINT
  INPUT "Ganancia para control de CO2 Disuelto (-1
para suprimir control)":GAINCO2D : PRINT
  INPUT "Tiempo de control para CO2 Disuelto (seg)":
TCONTRLCO2D! : PRINT

  PRINT "Factor de Corrección por Diferencia de
Presión de las Condiciones Estándar"
  INPUT "= 1.225 para Cuernavaca": ALFA
  IF ALFA=0 THEN ALFA=1.225:PRINT ALFA
  WINDOW CLOSE 2

CONSTANTES:
  TFS%=TFH%*3600
  NP=TFS%/TI%

  DIM DOP!(NP+10)
  DIM REDOXP!(NP+10)
  DIM CO2DP!(NP+10)

  DIM PHP!(NP+10)
  DIM O2P!(NP+10)
  DIM N2P!(NP+10)
  DIM CO2P!(NP+10)
  DIM TRHP!(NP+10)

  ARCHIVO1$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".DO
"
  ARCHIVO2$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".RD
X"
  ARCHIVO3$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".CO2
D"
  ARCHIVO4$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".PH"
  ARCHIVO5$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".O2"
  ARCHIVO6$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".N2"
  ARCHIVO7$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".CO2
"
  ARCHIVO8$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".TR"

  SPO2%=(FG%*O2I*.05)/(ALFA)
  SPN2%=(FG%*N2I*.05)/(ALFA)
  SPCO2%=(FG%*CO2I*.5)/(ALFA)

  CON1=1
  CON2=1

  IF NP = 207 THEN COMP%=0
  IF NP < 207 THEN COMP%=207/NP*(-1)
  IF NP > 207 THEN COMP%=NP/207

  OPEN "O",#1,ARCHIVO1$: CLOSE #1
  OPEN "O",#2,ARCHIVO2$: CLOSE #2
  OPEN "O",#3,ARCHIVO3$: CLOSE #3
  OPEN "O",#4,ARCHIVO4$: CLOSE #4
  OPEN "O",#5,ARCHIVO5$: CLOSE #5
  OPEN "O",#6,ARCHIVO6$: CLOSE #6
  OPEN "O",#7,ARCHIVO7$: CLOSE #7
  OPEN "O",#8,ARCHIVO8$: CLOSE #8

  CALL PANTALLA

INICIO:
  TIEMPO0=TIMER
  FECHAS=DATES
  DIAS=0
  TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
  TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400!)
  TIEMPO4=TIMER+(DIAS*86400!)

CICLO:
  IF FECHAS<DATES THEN DIAS=DIAS+1
  FECHAS=DATES
  TRH= CTE + ((TIMER-
TIEMPO0)+DIAS*86400&)/3600
  IF CON2=1 THEN TRH1=TRH

  CALL AOUT(SPO2%,SPN2%,SPCO2%,0)
  CALL AIN8(VARPTR(ENT%(0)))
  CALL ITOS (VARPTR (ENT%(0)),VARPTR
(ENT!(0)),0,7)

  DO!=(ENT!(0)*0.0095)-0.0316
```

```

FORECOLOR 33:LOCATE 7,16:PRINT USING
"Oxigeno Disuelto (%) = ###.##";DO!

REDOX!=ENT!(1)*.3021-1505.9
FORECOLOR 33:LOCATE 22,70:PRINT USING "P.
Redox (mv)= ###.##";REDOX!

CO2D!=ENT!(2)*.0219+.0428
FORECOLOR 409:LOCATE 20,70:PRINT USING
"CO2 Disuelto (mbar) = ###.##";CO2D!

PH!=(ENT!(3)*.0013)-0.0017
FORECOLOR 205:LOCATE 7,70:PRINT USING "pH =
###.##";PH!

FORECOLOR 33:LOCATE 20,6: PRINT "Entrada de
Gases"

O2!=(ENT!(5)*20*ALFA/FG%)
IF O2!<0 THEN O2!=0: IF O2!>100 THEN O2!=100
FORECOLOR 273:LOCATE 20,21:PRINT USING "O2:
###.##";O2!

N2!=(ENT!(6)*20*ALFA/FG%)
IF N2!<0 THEN N2!=0: IF N2!>100 THEN N2!=100
FORECOLOR 341:LOCATE 20,30:PRINT USING "N2:
###.##";N2!

CO2!=(ENT!(7)*20*ALFA/FG%)
IF CO2!<0 THEN CO2!=0: IF CO2!>100 THEN
CO2!=100
FORECOLOR 205:LOCATE 20,39:PRINT USING
"CO2: ###.##";CO2!

FORECOLOR 33:LOCATE 4,85:PRINT
DATE$:LOCATE 5,85:PRINT TIMES
FORECOLOR 137:LOCATE 18,15:PRINT USING
"Tiempo Transcurrido = ###.###
Hrs";TRH:FORECOLOR 33

DOS!=DO!+DOS!:DOP!(CON1)=DOS!/CON2

REDOXS!=REDOX!+REDOXS!:REDOXP!(CON1)=REDO
XS!/CON2

CO2DS!=CO2D!+CO2DS!:CO2DP!(CON1)=CO2DS!/CON2
PHS!=PH!+PHS!:PHP!(CON1)=PHS!/CON2
O2S!=O2!+O2S!:O2P!(CON1)=O2S!/CON2
N2S!=N2!+N2S!:N2P!(CON1)=N2S!/CON2
CO2S!=CO2!+CO2S!:CO2P!(CON1)=CO2S!/CON2
TRH2=TRH:TRHP!(CON1)=(TRH1+TRH2)/2

CALL PLOT (1,70,185,28,VARPTR
(DOP!(0),100,0,CON1,COMP%,0,1,0)
FORECOLOR 33:CALL PLOT (1,217,332,264,VARPTR
(REDOXP!(0),300,0,CON1,COMP%,0,1,0)
FORECOLOR 409:CALL PLOT (1,217,332,264,VARPTR
(CO2DP!(0),300,0,CON1,COMP%,0,1,0)
FORECOLOR 205:CALL PLOT (1,70,185,264,VARPTR
(PHP!(0),10,5,CON1,COMP%,0,1,0)
FORECOLOR 273:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR
(O2P!(0),100,0,CON1,COMP%,0,1,0)
FORECOLOR 341:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR
(N2P!(0),100,0,CON1,COMP%,0,1,0)
FORECOLOR 205:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR
(CO2P!(0),100,0,CON1,COMP%,0,1,0)

CON2=CON2+1

TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400!)

IF MOUSE(0) <> 0 THEN CALL PANTALLA

IF TRHP!(CON1) > TFH% THEN GOTO FINAL
IF (TIEMPO1-TIEMPO2) > = TI% THEN GOTO
SALVAR
IF (TIEMPO1-TIEMPO3) > = TCONTRLD0! THEN
GOTO CONTROLDO
IF (TIEMPO1-TIEMPO4) > = TCONTRLCO2D! THEN
GOTO CONTROLCO2D
GOTO CICLO

```

```

CONTROLDO:
VLT=(5*FG%)/ALFA
IF GAINDO = -1 THEN GOTO CONTROLCO2D
DIFDO!=SDO!-DOP!(CON1)
IF DIFDO! > TOLDO THEN
SPO2%=SPO2%+(DIFDO!*GAINDO)
IF DIFDO! < (-1*TOLDO) THEN SPO2%=SPO2%-
ABS(DIFDO!*GAINDO)
IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0:IF SPO2% > VLT
THEN SPO2%=VLT
IF SPCO2%<0 THEN SPCO2%=0:IF SPCO2% > VLT
THEN SPCO2%=VLT
SPN2%=(5*FG%/ALFA)-SPO2%-(1*SPCO2%)
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0:IF SPN2% > VLT
THEN SPN2%=VLT
TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400!)
FORECOLOR 341:LOCATE 8,16:PRINT USING
"Control OD: ###.##";SPO2%
GOTO CICLO

```

```

CONTROLCO2D:
VLT=(5*FG%)/ALFA
IF GAINCO2D = -1 THEN GOTO CICLO
DIFCO2D!=(SPCO2D!-CO2DP!(CON1))
IF DIFCO2D!>TOLCO2D THEN
SPCO2%=SPCO2%+(DIFCO2D!*GAINCO2D)
IF DIFCO2D! < (-1*TOLCO2D) THEN
SPCO2%=SPCO2%-ABS(DIFCO2D!*GAINCO2D)
IF SPCO2%<0 THEN SPCO2%=0:IF SPCO2% > VLT
THEN SPCO2%=VLT
IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0:IF SPO2% > VLT
THEN SPO2%=VLT
SPN2%=(5*FG%/ALFA)-SPO2%-(1*SPCO2%)
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0:IF SPN2% > VLT
THEN SPN2%=VLT
TIEMPO4=TIMER+(DIAS*86400!)
FORECOLOR 341:LOCATE 21,70:PRINT USING
"Control CO2D: ###.##";SPCO2%
GOTO CICLO

```

```

SALVAR:
OPEN "A",#1,ARCHIVO1$
OPEN "A",#2,ARCHIVO2$
OPEN "A",#3,ARCHIVO3$
OPEN "A",#4,ARCHIVO4$
OPEN "A",#5,ARCHIVO5$
OPEN "A",#6,ARCHIVO6$
OPEN "A",#7,ARCHIVO7$
OPEN "A",#8,ARCHIVO8$

WRITE #1, DOP!(CON1)
WRITE #2, REDOXP!(CON1)
WRITE #3, CO2DP!(CON1)
WRITE #4, PHP!(CON1)
WRITE #5, O2P!(CON1)
WRITE #6, N2P!(CON1)
WRITE #7, CO2P!(CON1)
WRITE #8, TRHP!(CON1)

CLOSE #1
CLOSE #2
CLOSE #3
CLOSE #4
CLOSE #5
CLOSE #6
CLOSE #7
CLOSE #8

CON1=CON1+1
CON2=1
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)

```

```

DOS!=0
REDOXS!=0
CO2DS!=0
PHS!=0
O2S!=0
N2S!=0
CO2S!=0

```

```

GOTO CICLO
FINAL:
WINDOW 3,,(165,100)-(370,300),2
BEEP : BEEP : BEEP : BEEP
CALL TEXTFACE (t)
PRINT
PRINT "EL TIEMPO DE FERMENTACION"
PRINT
PRINT "      HA TERMINADO"
CALL TEXTFACE (o)
BUTTON 1,1,"CONTINUAR",(20,145)-(180,160),1
BUTTON 2,1,"TERMINAR",(20,175)-(180,190),1
r%(0)=175
r%(1)=20
r%(2)=190
r%(3)=180
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZ 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(o)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(o)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(t)
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS:
WINDOW CLOSE 3: SYSTEM
IF BOTON=1 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3:
CALL PANTALLA: GOTO EXTRA
INTERAC:
NUMMENU=MENU(o): IF NUMMENU <> 1
THEN RETURN
ARTMENU=MENU(t)
ON ARTMENU GOSUB PARAM, DETENER,
REINICIAR, TERMINAR
RETURN
PARAM:
WINDOW 4,,(135,25)-(380,430),2
CALL TEXTFACE (t)
PRINT "  Parámetro a modificar:"
CALL TEXTFACE (o)
BUTTON 1,1,"Tiempo de Adquisición",(20,35)-
(210,50),1
BUTTON 2,1,"Tiempo de Fermentación",(20,65)-
(210,80),1
BUTTON 3,1,"Flujo de Gases",(20,95)-(210,110),1
BUTTON 4,1,"% de Oxígeno Disuelto
Deseado",(20,125)-(210,140),1
BUTTON 5,1,"CO2 Disuelto deseado
(mbar)",(20,155)-(210,170),1
BUTTON 6,1,"Tiempo de Control DO",
(20,185)-
(210,200),1
BUTTON 7,1,"Ganancia DO",
(20,215)-(210,230),1
BUTTON 8,1,"Tolerancia DO",
(20,245)-(210,260),1
BUTTON 9,1,"Ganancia CO2 Disuelto",
(20,275)-
(210,290),1
BUTTON 10,1,"Tolerancia CO2 Disuelto",
(20,305)-
(210,320),1
BUTTON 11,1,"Tiempo de control CO2
Disuelto",
(20,335)-(210,350),1
BUTTON 12,1,"OK",
(150,365)-(200,380),1
r%(0)=365
r%(1)=150
r%(2)=380
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZ 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(o)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(o)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(t)
IF BOTON=12 OR DIALOGO=6 THEN
WINDOW CLOSE 4: RETURN

```

```

ON BOTON GOSUB TADQ, TFER, FLG,
OXIDIS, CO2DIS, TCONDO, GANDO, TOLEDO,
GANCO2D, TOLECO2D, TCONCO2D
WINDOW CLOSE 4
RETURN
TADQ:
CLS
PRINT USING "Actual: ####.## seg."; TI%
INPUT "Tiempo de Adquisición"; TI%
GOTO PARAM
TFER:
CLS
PRINT USING "Actual: ####.## Hrs."; TFM%
INPUT "Tiempo de Fermentación"; TFM%
TFS&=TFM%*3600
NP=TFS&/TI%
IF NP = 207 THEN COMP%=0
IF NP < 207 THEN COMP%=207/NP*(-1)
IF NP > 207 THEN COMP%=NP/207
CON1 = 1
CON2 = 1
GOTO PARAM
FLG:
CLS
PRINT USING "Actual: ####.## SCCPM";
FG%
INPUT "Flujo Total de Gases"; FG%
GOTO PARAM
OXIDIS:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.## %"; SDO!
INPUT "% de Oxígeno Deseado"; SDO!
GOTO PARAM
CO2DIS:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.##"; SPCO2D!
INPUT "CO2 Disuelto Deseado"; SPCO2D!
GOTO PARAM
TCONDO:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.## seg.";
TCONTRLDO!
INPUT "Tiempo de Control"; TCONTRLDO!
GOTO PARAM
GANDO:
CLS
PRINT USING "Actual: ####.##"; GAINDO
INPUT "Ganancia para DO"; GAINDO
GOTO PARAM
TOLEDO:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.##
%DO"; TOLDO
INPUT "Tolerancia para DO"; TOLDO
GOTO PARAM
GANCO2D:
CLS
PRINT USING "Actual: ####.##";
GAINCO2D
INPUT "Ganancia para CO2 disuelto";
GAINCO2D
GOTO PARAM
TOLECO2D:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.## "; TOLCO2D
INPUT "Tolerancia para CO2 Disuelto";
TOLCO2D
GOTO PARAM
TCONCO2D:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.## seg.";
TCONTRLCO2D!
INPUT "Tiempo de Control"; TCONTRLCO2D!
GOTO PARAM
DETENER:
WINDOW 5,,(165,100)-(370,300),2
CALL TEXTFACE (t)
PRINT
PRINT " El sistema se ha detenido"
PRINT

```

```

PRINT " momentaneamente"
CALL TEXTFACE (o)
BUTTON 1,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
  r%(o)=175
  r%(1)=5
  r%(2)=190
  r%(3)=200
  InSetRect r%(o),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(o)),16,16
  PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(o)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(o)
WEND
  INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(o)),16,16
  CLS: WINDOW CLOSE 5
  RETURN

REINICIAR:
BEEP
WINDOW 6,,(165,100)-(370,300),2
PRINT
CALL TEXTFACE (i)
PRINT " ¿ REALMENTE DESEA"
PRINT " REINICIAR ? "
CALL TEXTFACE (o)
BUTTON 1,1,"Reiniciar",(5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
  r%(o)=175
  r%(1)=5
  r%(2)=190
  r%(3)=200
  InSetRect r%(o),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(o)),16,16
  PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(o)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(o)
WEND
  INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(o)),16,16
  BOTON=DIALOG(i)
  IF BOTON=1 THEN CLEAR:CLS:GOTO START
  IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS
:WINDOW CLOSE 6
  RETURN

TERMINAR:
BEEP
WINDOW 7,,(165,100)-(370,300),2
PRINT
CALL TEXTFACE (i)
PRINT " ¿ REALMENTE DESEA"
PRINT " TERMINAR ? "
CALL TEXTFACE (o)
BUTTON 1,1,"Terminar",(5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
  r%(o)=175
  r%(1)=5
  r%(2)=190
  r%(3)=200
  InSetRect r%(o),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(o)),16,16
  PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(o)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(o)
WEND
  INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(o)),16,16
  BOTON=DIALOG(i)
  IF BOTON=1 THEN SYSTEM
  IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS:
WINDOW CLOSE 7
  RETURN

EXTRA:
WINDOW 8,,(165,100)-(370,300),2

```

```

PRINT " Tiempo Adicional de "
PRINT " Fermentación (seg)"
PRINT USING "(No Exceder de ####.##
Hrs.)";TFH%
INPUT TA
TFS&= (TFH%*3600) + TA
TFH%= TFH% + (TA/3600)
NP = TFS&/TI%
CTE = TRH
CON1 = 1
CON2 = 1
CALL PANTALLA
WINDOW CLOSE 8
GOTO INICIO

```

```

PANT:
SUB PANTALLA STATIC
WINDOW 2,,(0,20)-(530,385)
CALL TEXTFONT (o)
CALL TEXTSIZE (14)
CALL TEXTFACE (65)
FORECOLOR 409
LOCATE 1,4: PRINT "National University of Mexico"
LOCATE 2,4: PRINT "Biotechnology Institute"
LOCATE 3,4: PRINT "Molecular Medicine and
Bioprocess Dept"
FORECOLOR 33
CALL PENSIZE (3,3)
CALL MOVETO (10,55): CALL LINETO (500,55): CALL
LINETO (500,350): CALL LINETO (10,350): CALL
LINETO (10,55)
CALL MOVETO (245,55): CALL LINETO (245,350)
CALL MOVETO (10,202): CALL LINETO (500,202)
CALL PENSIZE (2,2)
CALL MOVETO (28,70):CALL LINETO (28,185):CALL
LINETO(235,185)
CALL MOVETO (264,70):CALL LINETO
(264,185):CALL LINETO(490,185)
CALL MOVETO (28,217):CALL LINETO (28,332):CALL
LINETO(235,332)
CALL MOVETO (264,217):CALL LINETO
(264,332):CALL LINETO(490,332)
CALL PENSIZE (1,1)
CALL TEXTSIZE (6)
CALL TEXTFONT (i)
CALL TEXTFACE (o)
LOCATE 9,4: PRINT "100"
LOCATE 24,6: PRINT "0"
LOCATE 9,65: PRINT "10"
LOCATE 24,65: PRINT "5"
LOCATE 28,4: PRINT "100"
LOCATE 42,6: PRINT "0"
LOCATE 28,63: PRINT "300"
LOCATE 42,64: PRINT "0"
CALL TEXTFONT (21)
CALL TEXTSIZE(9)
END SUB

```

```

BYPASS:
ARCHIVOS="JASP"
TI%=20
TFH%=144
FG%=400
N2I=74.26
O2I=19.74
CO2I=6
SDO!=50
TCONTRLDO!=60
TCONTRLCO2D!=60
GAINDO=1
TOLDO=1
GAINCO2D=0.5
TOLCO2D=1
SPCO2D!=51
ALFA=1.225
GOTO CONSTANTES

```

PROGRAMA 2: PROGRAMA DE CONTROL PARA CULTIVOS A OD, PH Y DCO₂ EN PERFILES OSCILATORIOS.

```

START:
LIBRARY "411DRIVERS INTERFACE"
LIBRARY "DATAMANIPULATION INTERFACE"
CALL MAINIT
CALL MSINIT (4,1,499,1)
CALL DOUT (0,63)
DIM ENT%(7): DIM ENT!(7)
CLS
  MENU 2,0,1,"":MENU OFF
  MENU 1,0,1,"INTERACTUAR"
  MENU 1,1,1,"CAMBIAR PARAMETROS":CMDKEY
1,1,"P"
  MENU 1,2,1,"DETENER":CMDKEY 1,2,"D"
  MENU 1,3,1,"REINICIAR":CMDKEY 1,3,"R"
  MENU 1,4,1,"TERMINAR":CMDKEY 1,4,"T"
  ON MENU GOSUB INTERAC: MENU ON

' GOTO BYPASS

PRINC:
WINDOW 2,"PARAMETROS", (0,40)-(510,380),1
INPUT "Nombre del Archivo (no repetir nombre ya
usado)": ARCHIVOS$: PRINT
INPUT "Intervalo de Adquisición de Datos (seg)":TI% :
PRINT
INPUT "Tiempo de la Fermentación (Hrs.):":TFH%:
PRINT
INPUT "Flujo Total de Gases de Entrada en ccpm (no
exceder de 1000)": FG% : PRINT

PRINT "Composición Inicial de los Gases de Entrada"
INPUT "% N2 (sugerido:74.26%)": N2I
IF N2I=0 THEN N2I=74.26:PRINT N2I
INPUT "% O2 (sugerido:19.74%)": O2I
IF O2I=0 THEN O2I=19.74:PRINT O2I
INPUT "% CO2 (sugerido: 6.0%)(10% máximo si flujo
total es 1000)": CO2I: PRINT
IF CO2I=0 THEN CO2I=6:PRINT CO2I

INPUT "% de Oxígeno Disuelto Deseado": SDO! :
PRINT
INPUT "Banda de Tolerancia para Oxígeno Disuelto
(+/- %DO)":TOLDO : PRINT
INPUT "Ganancia para Oxígeno Disuelto (-1 para
suprimir control)":GAINDO : PRINT
INPUT "Tiempo de control para O2 (seg)":
TCONTRLDO! : PRINT

INPUT "CO2 Disuelto Deseado inicial (en
mbar)":CO2DI%: PRINT
INPUT "Banda de Tolerancia para control de CO2
Disuelto (en mbar)":TOLCO2D : PRINT
INPUT "Ganancia para control de CO2 Disuelto (-1
para suprimir control)":GAINCO2D : PRINT
INPUT "Tiempo de control para CO2 Disuelto (seg)":
TCONTRLCO2D! : PRINT

PRINT "Factor de Corrección por Diferencia de
Presión de las Condiciones Estándar"
INPUT "= 1.225 para Cuernavaca": ALFA
IF ALFA=0 THEN ALFA=1.225:PRINT ALFA

INPUT "Periodo de oscilación (seg)": PER% : PRINT
INPUT "CO2 Disuelto Deseado en Up (en
mbar)":SPCO2DENUP%: PRINT
INPUT "CO2 Disuelto Deseado en Down (en
mbar)":SPCO2DENDOWN%: PRINT

WINDOW CLOSE 2

CONSTANTES:
TFS%=TFH%/3600
NP=TFS%/TI%

DIM DOP!(NP+10)
DIM REDOXP!(NP+10)

DIM CO2DP!(NP+10)
DIM PHP!(NP+10)
DIM O2P!(NP+10)
DIM N2P!(NP+10)
DIM CO2P!(NP+10)
DIM TRHP!(NP+10)

ARCHIVO1$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".DO
"
ARCHIVO2$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".RD
X"
ARCHIVO3$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".CO2
D"
ARCHIVO4$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".PH"
ARCHIVO5$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".O2"
ARCHIVO6$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".N2"
ARCHIVO7$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".CO2
"
ARCHIVO8$="MACINTOSH
HD:USUARIOS:SERRATO:DATOS:"+ARCHIVOS$+".TR"

REM"Salida en mV para las aperturas de las valvulas
SPO2%=((FG%*O2I*.05)/(ALFA))
SPN2%=((FG%*N2I*.05)/(ALFA))
SPCO2%=((FG%*CO2I*.5)/(ALFA))
SPCO2D!=CO2DI%

CON1=1
CON2=1

IF NP = 207 THEN COMP%=0
IF NP < 207 THEN COMP%=207/NP*(-1)
IF NP > 207 THEN COMP%=NP/207

OPEN "O",#1,ARCHIVO1$: CLOSE #1
OPEN "O",#2,ARCHIVO2$: CLOSE #2
OPEN "O",#3,ARCHIVO3$: CLOSE #3
OPEN "O",#4,ARCHIVO4$: CLOSE #4
OPEN "O",#5,ARCHIVO5$: CLOSE #5
OPEN "O",#6,ARCHIVO6$: CLOSE #6
OPEN "O",#7,ARCHIVO7$: CLOSE #7
OPEN "O",#8,ARCHIVO8$: CLOSE #8

CALL PANTALLA

INICIO:
TIEMPO0=TIMER
FECHAS=DATES
DIAS=0
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO4=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO5=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO6=TIMER+(DIAS*86400!)

CICLO:
IF FECHAS<DATES THEN DIAS=DIAS+1
FECHAS=DATES
TRH= CTE + ((TIMER-
TIEMPO0)+DIAS*86400&)/3600
IF CON2=1 THEN TRH1=TRH

CALL AOUT(SPO2%,SPN2%,SPCO2%,0)
CALL AIN8(VARPTR(ENT%(0)))
CALL ITOS (VARPTR (ENT%(0)),VARPTR
(ENT!(0)),0,7)

DO!=(ENT!(0)*.0095)-.0316

```

```

FORECOLOR 33:LOCATE 7,16:PRINT USING
"Oxigeno Disuelto (%) = ###.##";DO!

REDOX!=ENT!(3)*.3021-1505.9
FORECOLOR 33:LOCATE 22,70:PRINT USING "P.
Redox (mv)= ###.##";REDOX!

CO2D!=ENT!(2)*.0219+.0428
FORECOLOR 409:LOCATE 20,70:PRINT USING
"CO2 Disuelto (mbar) = ###.##";CO2D!

PH!=(ENT!(1)*.0013)-.0017
FORECOLOR 205:LOCATE 7,70:PRINT USING "pH =
###.##";PH!

FORECOLOR 33:LOCATE 20,6: PRINT "Entrada de
Gases"

O2!=(ENT!(5)*20*ALFA/FG%)
IF O2!<0 THEN O2!=0
IF O2!>100 THEN O2!=100
FORECOLOR 273:LOCATE 20,21:PRINT USING "O2:
###.##";O2!

N2!=(ENT!(6)*20*ALFA/FG%)
IF N2!<0 THEN N2!=0
IF N2!>100 THEN N2!=100
FORECOLOR 341:LOCATE 20,30:PRINT USING "N2:
###.##";N2!

CO2!=(ENT!(7)*20*ALFA/FG%)
IF CO2!<0 THEN CO2!=0
IF CO2!>100 THEN CO2!=100
FORECOLOR 205:LOCATE 20,39:PRINT USING
"CO2: ###.##";CO2!

FORECOLOR 33:LOCATE 4,85:PRINT
DATES!:LOCATE 5,85:PRINT TIMES
FORECOLOR 137:LOCATE 18,15:PRINT USING
"Tiempo Transcurrido = ###.##"
Hrs";TRH:FORECOLOR 33

DOS!=DO!+DOS!:DOP!(CON1)=DOS!/CON2

REDOXS!=REDOX!+REDOXS!:REDOXP!(CON1)=REDO
XS!/CON2

CO2DS!=CO2D!+CO2DS!:CO2DP!(CON1)=CO2DS!/CON2
PHS!=PH!+PHS!:PHP!(CON1)=PHS!/CON2
O2S!=O2!+O2S!:O2P!(CON1)=O2S!/CON2
N2S!=N2!+N2S!:N2P!(CON1)=N2S!/CON2
CO2S!=CO2!+CO2S!:CO2P!(CON1)=CO2S!/CON2
TRH2=TRH:TRHP!(CON1)=(TRH1+TRH2)/2

CALL PLOT (1,70,185,28,VARPTR
(DOP!(o),100,o,CON1,COMP%,o,i,o)
FORECOLOR 33:CALL PLOT (1,217,332,264,VARPTR
(REDOXP!(o),300,o,CON1,COMP%,o,i,o)
FORECOLOR 409:CALL PLOT (1,217,332,264,VARPTR
(CO2DP!(o),300,o,CON1,COMP%,o,i,o)
FORECOLOR 205:CALL PLOT (1,70,185,264,VARPTR
(PHP!(o),105,CON1,COMP%,o,i,o)
FORECOLOR 273:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR
(O2P!(o),100,o,CON1,COMP%,o,i,o)
FORECOLOR 341:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR
(N2P!(o),100,o,CON1,COMP%,o,i,o)
FORECOLOR 205:CALL PLOT (1,217,332,28,VARPTR
(CO2P!(o),100,o,CON1,COMP%,o,i,o)

CON2=CON2+1

TIEMPO1=TIMER+(DIAS*86400!)

IF MOUSE(o) <> 0 THEN CALL PANTALLA

IF TRHP!(CON1) > TFH% THEN GOTO FINAL
IF (TIEMPO1-TIEMPO2) > = TI% THEN GOTO
SALVAR
IF (TIEMPO1-TIEMPO3) > = TCONTRLD0! THEN
GOTO CONTROLDO

```

```

IF SPCO2D!=SPCO2DENUP% AND (TIEMPO1-
TIEMPO4) > = TCONTRLCO2D! THEN GOTO
CONTROLCO2D
IF SPCO2D!=SPCO2DENDOWN% AND (TIEMPO1-
TIEMPO4) > = TCONTRLCO2D! THEN GOTO
CONTROLCO2D
IF (TIEMPO1-TIEMPO5) > = PER% /2 THEN GOTO
CO2DUP
IF (TIEMPO1-TIEMPO6) > = PER% THEN GOTO
CO2DDOWN
GOTO CICLO

CO2DUP:
TIEMPO5=TIMER+(DIAS*86400!)
SPCO2D!=SPCO2DENUP%
FORECOLOR 341:LOCATE 9,16:PRINT USING "Set
point de CO2D Up: ###.##";SPCO2D!
GOTO CICLO

CO2DDOWN:
SPCO2D!=SPCO2DENDOWN%
FORECOLOR 205:LOCATE 9,16:PRINT USING "Set
point de CO2D Down: ###.##";SPCO2D!
TIEMPO6=TIMER+(DIAS*86400!)
TIEMPO5=TIEMPO6
GOTO CICLO

CONTROLCO2D:
VLT=(5*FG%)/ALFA
VLT2=(25*FG%)/ALFA
IF GAINCO2D = -1 THEN GOTO CICLO
DIFCO2D!=(SPCO2D!-CO2DP!(CON1))
IF DIFCO2D!>TOLCO2D THEN
SPCO2%=SPCO2%+(DIFCO2D!*GAINCO2D)
IF DIFCO2D! < (-1*TOLCO2D) THEN
SPCO2%=SPCO2%-ABS(DIFCO2D!*GAINCO2D)
IF SPCO2%<0 THEN SPCO2%=0
IF SPCO2% > VLT2 THEN SPCO2%=VLT2
IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0
IF SPO2% > VLT THEN SPO2%=VLT
SPN2%=(5*FG%/ALFA)-SPO2%-(.1*SPCO2%)
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0
IF SPN2% > VLT THEN SPN2%=VLT
TIEMPO4=TIMER+(DIAS*86400!)
FORECOLOR 341:LOCATE 21,70:PRINT USING
"Control CO2D: ###.##";SPCO2%
GOTO CICLO

CONTROLDO:
VLT=(5*FG%)/ALFA
TIEMPO3=TIMER+(DIAS*86400!)
IF GAINDO = -1 THEN GOTO CICLO
DIFDO!=SDO!-DOP!(CON1)
IF DIFDO! > TOLDO THEN
SPO2%=SPO2%+(DIFDO!*GAINDO)
IF DIFDO! < (-1*TOLDO) THEN SPO2%=SPO2%-
ABS(DIFDO!*GAINDO)
IF SPO2% < 0 THEN SPO2%=0
IF SPO2% > VLT THEN SPO2%=VLT
SPN2%=(5*FG%/ALFA)-SPO2%-(.1*SPCO2%)
IF SPN2% < 0 THEN SPN2%=0
IF SPN2% > VLT THEN SPN2%=VLT
FORECOLOR 341:LOCATE 8,16:PRINT USING
"Control OD: ###.##";SPO2%
GOTO CICLO

SALVAR:
OPEN "A",#1,ARCHIVO1$
OPEN "A",#2,ARCHIVO2$
OPEN "A",#3,ARCHIVO3$
OPEN "A",#4,ARCHIVO4$
OPEN "A",#5,ARCHIVO5$
OPEN "A",#6,ARCHIVO6$
OPEN "A",#7,ARCHIVO7$
OPEN "A",#8,ARCHIVO8$

WRITE #1, DOP!(CON1)
WRITE #2, REDOXP!(CON1)
WRITE #3, CO2DP!(CON1)
WRITE #4, PHP!(CON1)

```

```

WRITE #5, O2P!(CON1)
WRITE #6, N2P!(CON1)
WRITE #7, CO2P!(CON1)
WRITE #8, TRHP!(CON1)

CLOSE #1
CLOSE #2
CLOSE #3
CLOSE #4
CLOSE #5
CLOSE #6
CLOSE #7
CLOSE #8

CON1=CON1+1
CON2=1
TIEMPO2=TIMER+(DIAS*86400)

DOS!=0
REDOXS!=0
CO2DS!=0
PHS!=0
O2S!=0
N2S!=0
CO2S!=0

GOTO CICLO

FINAL:
WINDOW 3,(165,100)-(370,300),2
BEEP : BEEP : BEEP : BEEP
CALL TEXTFACE (t)
PRINT
PRINT "EL TIEMPO DE FERMENTACION"
PRINT
PRINT "      HA TERMINADO"
CALL TEXTFACE (o)
BUTTON 1,1,"CONTINUAR",(20,145)-(180,160),1
BUTTON 2,1,"TERMINAR",(20,175)-(180,190),1
  r%(0)=175
  r%(1)=20
  r%(2)=190
  r%(3)=180
  InSetRect r%(0),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(o)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(o)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(t)
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS:
WINDOW CLOSE 3: SYSTEM
IF BOTON=1 THEN CLS: WINDOW CLOSE 3:
CALL PANTALLA: GOTO EXTRA

INTERAC:
  NUMMENU=MENU(o): IF NUMMENU <> 1
  THEN RETURN
  ARTMENU=MENU(t)
  ON ARTMENU GOSUB PARAM, DETENER,
  REINICIAR, TERMINAR
  RETURN
PARAM:
  WINDOW 4,(135,25)-(380,430),2
  CALL TEXTFACE (t)
  PRINT "  Parámetro a modificar:"
  CALL TEXTFACE (o)
  BUTTON 1,1,"Tiempo de Adquisición",(20,35)-
(210,50),1
  BUTTON 2,1, "Tiempo de Fermentación",(20,65)-
(210,80),1
  BUTTON 3,1,"Flujo de Gases",(20,95)-(210,110),1
  BUTTON 4,1,"% de Oxígeno Disuelto
Deseado",(20,125)-(210,140),1
  BUTTON 5,1,"CO2 Disuelto deseado
(mbar)",(20,155)-(210,170),1

  BUTTON 6,1,"Tiempo de Control DO",(20,185)-
(210,200),1
  BUTTON 7,1,"Ganancia DO",(20,215)-(210,230),1
  BUTTON 8,1,"Tolerancia DO",(20,245)-(210,260),1
  BUTTON 9,1,"Ganancia CO2 Disuelto",(20,275)-
(210,290),1
  BUTTON 10,1,"Tolerancia CO2 Disuelto",(20,305)-
(210,320),1
  BUTTON 11,1,"Tiempo de control CO2
Disuelto",(20,335)-(210,350),1
  BUTTON 12,1,"OK",(150,365)-(200,380),1
  r%(0)=365
  r%(1)=150
  r%(2)=380
  r%(3)=200
  InSetRect r%(0),-4,-4
  PENSIZE 3,3
  FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
  PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(o)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
  DIALOGO=DIALOG(o)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(t)
IF BOTON=12 OR DIALOGO=6 THEN
WINDOW CLOSE 4: RETURN
ON BOTON GOSUB TADQ, TFER, FLG,
OXIDIS, CO2DIS, TCONDO, GANDO, TOLEDO,
GANCO2D,TOLECO2D, TCÓNCO2D
WINDOW CLOSE 4
RETURN
TADQ:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ####.## seg."; TI%
  INPUT "Tiempo de Adquisición"; TI%
  GOTO PARAM
TFER:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ####.## Hrs."; TFH%
  INPUT "Tiempo de Fermentación"; TFH%
  TFS&=TFH%*3600
  NP=TFS/TI%
  IF NP = 207 THEN COMP%=0
  IF NP < 207 THEN COMP%=207/NP*(-1)
  IF NP > 207 THEN COMP%=NP/207
  CON1 = 1
  CON2 = 1
  GOTO PARAM
FLG:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ####.## SCCPM";
FG%
INPUT "Flujo Total de Gases"; FG%
GOTO PARAM
OXIDIS:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.## %"; SDO!
  INPUT "% de Oxígeno Deseado"; SDO!
  GOTO PARAM
CO2DIS:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.##"; SPCO2D!
  INPUT "CO2 Disuelto Deseado"; SPCO2D!
  GOTO PARAM
TCONDO:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.## seg.";
TCONTRLDO!
INPUT "Tiempo de Control"; TCONTRLDO!
GOTO PARAM
GANDO:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ####.##"; GAINDO
  INPUT "Ganancia para DO"; GAINDO
  GOTO PARAM
TOLEDO:
  CLS
  PRINT USING "Actual: ###.##
%DO";TOLDO
INPUT "Tolerancia para DO"; TOLDO

```



```

GOTO PARAM
GANCO2D:
CLS
PRINT USING "Actual: ####.##";
GAINCO2D
INPUT "Ganancia para CO2 disuelto";
GAINCO2D
GOTO PARAM
TOLECO2D:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.##";TOLCO2D
INPUT "Tolerancia para CO2 Disuelto";
TOLCO2D
GOTO PARAM
TCONCO2D:
CLS
PRINT USING "Actual: ###.## seg.";
TCONTRLCO2D!
INPUT "Tiempo de Control"; TCONTRLCO2D!
GOTO PARAM

```

```

DETENER:
WINDOW 5,,(165,100)-(370,300),2
CALL TEXTFACE (1)
PRINT
PRINT " El sistema se ha detenido"
PRINT
PRINT " momentaneamente"
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZE 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
CLS: WINDOW CLOSE 5
RETURN

```

```

REINICIAR:
BEEP
WINDOW 6,,(165,100)-(370,300),2
PRINT
CALL TEXTFACE (1)
PRINT " ¿ REALMENTE DESEA"
PRINT " REINICIAR ? "
CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Reiniciar",(5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZE 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=1 THEN CLEAR:CLS:GOTO START
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS
:WINDOW CLOSE 6
RETURN

```

```

TERMINAR:
BEEP
WINDOW 7,,(165,100)-(370,300),2
PRINT
CALL TEXTFACE (1)
PRINT " ¿ REALMENTE DESEA"
PRINT " TERMINAR ? "

```

```

CALL TEXTFACE (0)
BUTTON 1,1,"Terminar",(5,135)-(200,150),1
BUTTON 2,1,"Continuar",(5,175)-(200,190),1
r%(0)=175
r%(1)=5
r%(2)=190
r%(3)=200
InSetRect r%(0),-4,-4
PENSIZE 3,3
FRAMEROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
PENNORMAL
DIALOGO=DIALOG(0)
WHILE DIALOGO<>1 AND DIALOGO<>6
DIALOGO=DIALOG(0)
WEND
INVERTROUNDRECT VARPTR(r%(0)),16,16
BOTON=DIALOG(1)
IF BOTON=1 THEN SYSTEM
IF BOTON=2 OR DIALOGO=6 THEN CLS:
WINDOW CLOSE 7
RETURN

```

```

EXTRA:
WINDOW 8,,(165,100)-(370,300),2
PRINT " Tiempo Adicional de "
PRINT " Fermentación (seg)"
PRINT USING "(No Exceder de ####.##
Hrs.)";TFH%
INPUT TA
TFS& = (TFH%*3600) + TA
TFH% = TFH% + (TA/3600)
NP = TFS&/TI%
CTE = TRH
CON1 = 1
CON2 = 1
CALL PANTALLA
WINDOW CLOSE 8
GOTO INICIO

```

```

PANT:
SUB PANTALLA STATIC
WINDOW 2,,(0,20)-(530,385)
CALL TEXTFONT (0)
CALL TEXTSIZE (14)
CALL TEXTFACE (65)
FORECOLOR 409
LOCATE 1,4: PRINT "National University of Mexico"
LOCATE 2,4: PRINT "Biotechnology Institute"
LOCATE 3,4: PRINT "Molecular Medicine and
Bioprocess Dept"
FORECOLOR 33
CALL PENSIZE (3,3)
CALL MOVETO (10,55): CALL LINETO (500,55): CALL
LINETO (500,350): CALL LINETO (10,350): CALL
LINETO (10,55)
CALL MOVETO (245,55): CALL LINETO (245,350)
CALL MOVETO (10,202): CALL LINETO (500,202)
CALL PENSIZE (2,2)
CALL MOVETO (28,70):CALL LINETO (28,185):CALL
LINETO(235,185)
CALL MOVETO (264,70):CALL LINETO
(264,185):CALL LINETO(490,185)
CALL MOVETO (28,217):CALL LINETO (28,332):CALL
LINETO(235,332)
CALL MOVETO (264,217):CALL LINETO
(264,332):CALL LINETO(490,332)
CALL PENSIZE (1,1)
CALL TEXTSIZE (6)
CALL TEXTFONT (1)
CALL TEXTFACE (0)
LOCATE 9,4: PRINT "100"
LOCATE 24,6: PRINT "0"
LOCATE 9,65: PRINT "10"
LOCATE 24,65: PRINT "5"
LOCATE 28,4: PRINT "100"
LOCATE 42,6: PRINT "0"
LOCATE 28,63: PRINT "300"
LOCATE 42,64: PRINT "0"
CALL TEXTFONT (21)
CALL TEXTSIZE(9)
END SUB

```

BYPASS:

ARCHIVO\$="JASP"
TI%=20
TFH%=144
FG%=400
N2I=74.26
O2I=19.74
CO2I=6
SDO!=50
TCONTRLDO!=60
TCONTRLCO2D!=60
GAINDO=1
TOLDO=1
GAINCO2D=.5
TOLCO2D=1
SPCO2D!=51
ALFA=1.225
GOTO CONSTANTE

Heterogeneous Conditions in Dissolved Oxygen Affect N-Glycosylation but Not Productivity of a Monoclonal Antibody in Hybridoma Cultures

J. Antonio Serrato, Laura A. Palomares, Angélica Meneses-Acosta,*
Octavio T. Ramírez

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62250, Mexico; telephone: +1 (52777) 329-1646, +1 (52777) 329-1617; fax: +1 (52777) 313-8811; e-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

Received 23 December 2003; accepted 10 June 2004

Published online 16 September 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20232

Abstract: It is known that heterogeneous conditions exist in large-scale animal cell cultures. However, little is known about how heterogeneities affect cells, productivities, and product quality. To study the effect of non-constant dissolved oxygen tension (DOT), hybridomas were subjected to sinusoidal DOT oscillations in a one-compartment scale-down simulator. Oscillations were forced by manipulating the inlet oxygen partial pressure through a feedback control algorithm in a 220-mL bioreactor maintained at a constant agitation. Such temporal DOT oscillations simulate spatial DOT gradients that can occur in large scales. Different oscillation periods, in the range of 800 to 12,800 s (axis of 7% (air saturation) and amplitude of 7%), were tested and compared to constant DOT (10%) control cultures. Oscillating DOT decreased maximum cell concentrations, cell growth rates, and viability indexes. Cultures at oscillating DOT had an increased glycolytic metabolism that was evidenced by a decrease in yield of cells on glucose and an increase in lactate yield. DOT gradients, even several orders of magnitude higher than those expected under practical large-scale conditions, did not significantly affect the maximum concentration of an IgG₁ monoclonal antibody (MAb). The glycosylation profile of the MAb produced at a constant DOT of 10% was similar to that reported in the literature. However, MAb produced under oscillating culture conditions had a higher amount of tri-antennary and sialylated glycans, which can interfere with effector functions of the antibody. It was shown that transient excursions of hybridomas to limiting DOT, as occurs in deficiently mixed large-scale bioreactors, is important to culture performance as the oscillation period, and thus the time cells spent at low DOT, affected cell growth, metabolism, and the glycosylation pattern of MAb. Such

results underline the importance of monitoring protein characteristics for the development of large-scale processes. © 2004 Wiley Periodicals, Inc.

Keywords: scale-down; hybridomas; gradients; glycosylation; monoclonal antibodies

INTRODUCTION

Recent and prospective approval of pharmaceuticals produced by animal cells is demanding increasingly larger bioreactors. Accordingly, several 10⁴-L bioreactors for animal cell culture have been recently built (Birch, 2000; Hu and Aunins, 1997; Varley and Birch, 1999). However, traditional scale-up strategies and the nature of large-scale operation result in environmental conditions that differ substantially from those found in small-scale cultures, due in part to deficient mixing (Palomares and Ramírez, 2000a). A consequence is the appearance of a heterogeneous environment, particularly in dissolved oxygen tension (DOT) that can be exacerbated by high cellular demands present in fed-batch or perfusion cultures. DOT gradients have been predicted even in small-scale animal cell reactors when high cell concentrations (10⁷ cell mL⁻¹) are present (Tramper et al., 1996). Nienow et al. (1996) and Langheinrich et al. (1998) characterized an 8-m³ animal cell reactor and concluded that the existence of DOT and pH gradients was very probable. Such a possibility has been confirmed by experimental evidence, as heterogeneities in CO₂, micro-carrier concentration, and pH have been observed in animal cell reactors even at pilot-plant scales (Garnier et al., 1996; Gray et al., 1996; Ozturk, 1996; Palomares and Ramírez, 2000a). It can be expected that a heterogeneous environment will affect animal cell process productivity, as has been reported for bacterial and yeast cultures (Cortés et al., in press; Lidén, 2002; Trujillo-Roldán et al., 2001). However, the effect of heterogeneous conditions in the metabolism of

Correspondence to: Octavio T. Ramírez

*Present address: Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos and Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional.

Contract grant sponsors: CONACyT; PAPIIT UNAM

Contract grant numbers: 33348-B and NC-230; ES-218202 and IN-118904

animal cells and yield of products remains scarcely studied, in part because of the difficulty of experimenting at large scales (Palomares and Ramírez, 2000b). A laboratory-scale alternative to investigate the effects of a heterogeneous environment in large-scale cultures is the so-called "scale-down" methodology proposed by Oosterhuis (1984). Such a methodology allows the prediction of potential problems at the larger scale, the identification of causes of existing problems, and the design of better scaling-up and operation strategies (Palomares and Ramírez, 2000b).

Oxygen tightly regulates animal cell metabolism, and due to its low solubility, transfer and mixing deficiencies can rapidly lead to DOT heterogeneities. In hybridomas, which exhibit a high glycolytic activity even in aerobic conditions, oxygen determines the consumption rates of carbon and energy sources (glucose and glutamine) and the production of toxic metabolites such as lactate and ammonia (Miller et al., 1988; Ozturk and Palsson, 1991; Shi et al., 1993). The intracellular redox state is also a function of DOT (Hevehan and Miller, 1999; Zupke et al., 1995). Optimum DOT between 20% and 80% have been reported for hybridoma growth (Ozturk and Palsson, 1991), although adequate growth at DOT as high as 130% has been found (Jan et al., 1997; Ogawa et al., 1992). On the other hand, limiting DOT (below 2%) increases hybridoma viability (Miller et al., 1988; Ozturk and Palsson, 1990). The specific monoclonal antibody (MAB) production rate has been shown to remain constant throughout a wide range of DOT (Ozturk and Palsson, 1991; Shi et al., 1993), although an optimum DOT between 10% and 80% has been reported for MAB concentration (Ozturk and Palsson, 1991). In contrast to the relatively abundant reports of the effect of constant DOT on hybridoma metabolism, physiology, and culture performance, no information exists for the case of fluctuating DOT. Furthermore, to our knowledge, only Kunkel et al. (1998, 2000) have determined the effect of constant DOT on MAB glycosylation. In particular, a decrease in galactosylation of a MAB as DOT decreased from 50% to 10% was observed (Kunkel et al., 1998). Changes in glycosylation of an IgG_{2a} have also been reported with changes in other environmental variables, such as osmolarity and dissolved CO₂ concentrations (Schmelzer and Miller, 2002). Such subtle differences in the glycosylation profile should be identified as early as possible during process development, as they can have a profound effect on protein characteristics, such as activity, stability, in vivo half-life, and potency (Palomares et al., 2004). In particular, the glycosylation profile of MAB determines the efficiency of complement mediated lysis and attachment and activation of Fcγ receptors, among others (Jefferis et al., 1998; Kunkel et al., 1998; Ma and Nashabeh, 1999; Mimura et al., 2000; Wright and Morrison, 1997). Such functionality is of importance when MAB effector functions are required.

In this work, DOT gradients were simulated in a one-compartment scale-down system to investigate the effects of heterogeneities in a murine hybridoma producing an IgG₁ MAB. DOT gradients were simulated by oscillating

DOT during batch cultures. Growth and MAB production kinetics, consumption and production of key nutrients and metabolites, and the glycosylation profile of the MAB produced under different oscillation periods were assessed. To our knowledge, this work is the first to assess the effect of fluctuating DOT on hybridoma culture performance, including the quality and quantity of MAB. The results obtained can be utilized for the rational design of improved large-scale operation strategies.

MATERIALS AND METHODS

Cell Line and Culture Medium

A murine hybridoma, designated BCF2, that secretes a monoclonal antibody (IgG₁) against the toxin 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann (Zamudio et al., 1992) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 3.7 g L⁻¹ of sodium bicarbonate, 4.5 g L⁻¹ of glucose, 4 mM glutamine, 0.8 mg L⁻¹ of insulin, and 10% fetal bovine serum (GIBCO, Carlsbad, CA). Inocula for all bioreactors were obtained from exponentially growing cultures in T-flasks at a cell concentration of ca. 1.1×10^6 cell mL⁻¹ and viabilities higher than 90%. All bioreactor cultures were seeded with a cell concentration of 0.1×10^6 cell mL⁻¹ and cultures were stopped when viability was below 40%.

Scale-Down Simulator

A one-compartment scale-down simulator was designed and utilized in this study. It consisted of a standard bioreactor with a nominal volume of 500 mL and a working volume of 220 mL with a small liquid height-to-tank diameter ratio of 1/3. A constant agitation rate of 120 rpm was provided with a suspended magnetic bar and a second impeller at the liquid surface for improving mass transfer from the gas overlay. Only surface aeration was used to prevent shear damage from bursting bubbles. Such a configuration resulted in a $k_L a$ of 7.7 h⁻¹ and a system response time of 468 s. The reactor was equipped with glass sterilizable electrodes for monitoring pH and redox potential (Mettler Toledo, Toledo, OH) and a polarographic electrode for DOT measurements. DOT is reported as saturation percentage with respect to air at 37°C and 0.85 atm, the conditions used for operation.

The inlet gas composition was controlled and measured through individual mass flow controllers (Brooks Instrument, Emerson Process Management, Austin, TX) connected through a MacAdios 411 interface (GW Instruments, Somerville, MA) to a computer. A mixture of oxygen, nitrogen, and CO₂ was supplied to the reactor. A program in QuickBasic was written to control DOT at predetermined values. In control cultures, DOT was kept constant at 10% ± 1% by maintaining the total gas flow rate constant at 600 mL min⁻¹ and varying the O₂/N₂ composition through a

proportional feedback control algorithm (see Fig. 1A, B). pH was controlled at 7.2 by manipulating the CO₂ concentration in the inlet gas through a proportional feedback algorithm. Oscillation periods of 800, 1,600, 6,400, and 12,800 s, with a predetermined oscillation axis of 7% and amplitude of $\pm 7\%$, were tested. Oscillatory DOT conditions were obtained by fluctuating the flow of oxygen following a square wave profile, and compensating for changes in oxygen consumption during cell growth through a feedback control sub-routine (see Fig. 2B). The CO₂ partial pressure was manipulated to compensate for pH changes along the culture. Cultures at each condition, including controls, were performed in triplicate.

Analytical

Cell concentration was determined with a Coulter Counter Multisizer II (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Cell via-

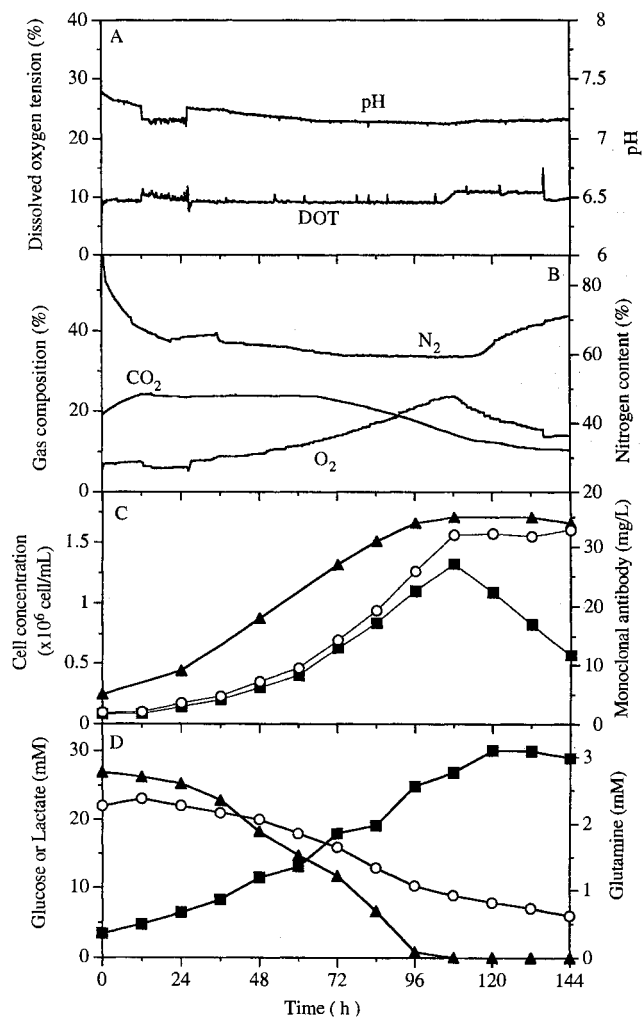


Figure 1. Control culture with DOT maintained at a constant value of 10%. (A) pH and dissolved oxygen profiles. (B) Inlet gas composition. (C) Viable (■) and total (○) cell concentrations and monoclonal antibody concentration (▲). MAb was assayed once daily for the first 3 days and twice daily for the remaining culture time. (D) Glucose (○), lactate (■), and glutamine (▲) concentrations.

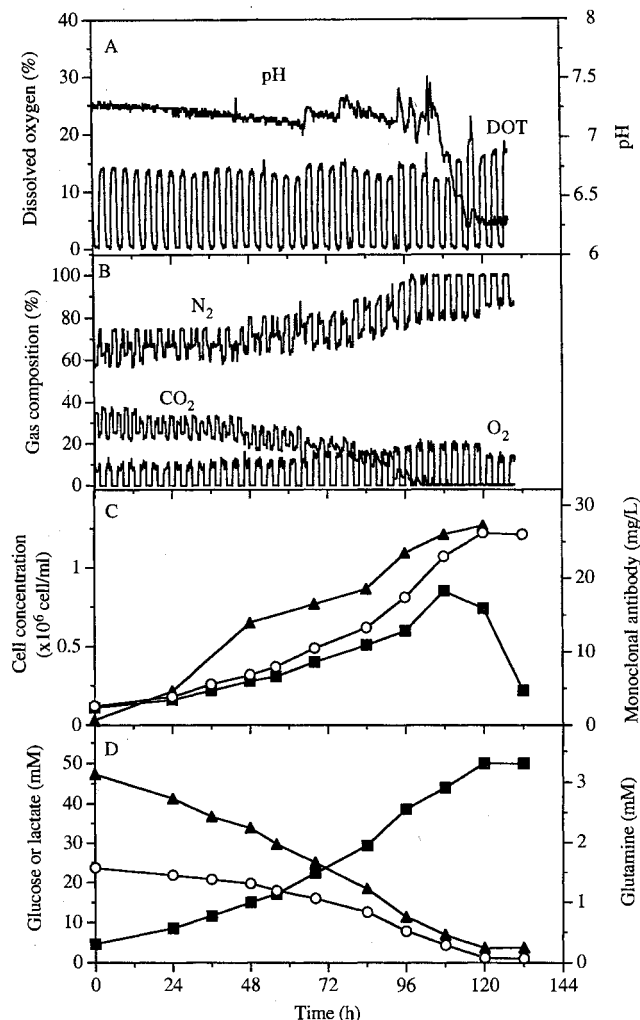


Figure 2. Typical batch culture at oscillating DOT. For the culture shown, DOT was controlled at a sinusoidal oscillatory value with a predetermined axis of 7%, an amplitude of $\pm 7\%$, and a period of 12,800 s. Data symbols as in Fig. 1.

bility was determined through Trypan blue exclusion in a hemacytometer. Glucose, lactate, and glutamine concentrations were determined with a YSI biochemical analyzer (YSI Instruments, Yellow Springs, OH). MAb concentration was determined through an ELISA as described elsewhere (Higareda et al., 1994), and using a mouse MAb of known concentration as standard. Purified IgG concentration was determined utilizing the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA), utilizing bovine IgG as standard.

MAb Purification and Glycan Analysis

MAb collected from the supernatant at the end of the culture (around 40% viability) was purified with a Sepharose-protein A column (Pharmacia). Culture supernatant was concentrated 10 \times by ultrafiltration with a 100-kDa Centricon Plus (Millipore, Billerica, MA), pH, and ionic strength were adjusted to those in the binding buffer (1.5 M glycine, pH 9, 3 M sodium chloride). The column was equilibrated

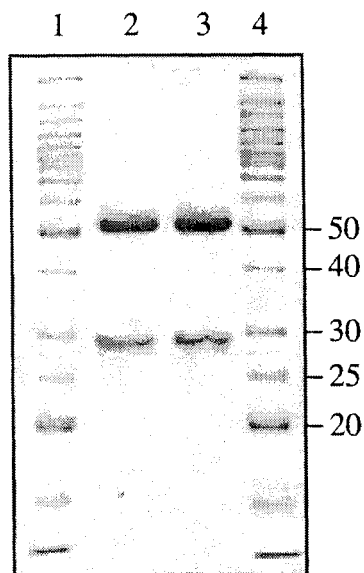


Figure 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified MAb. Antibody (2 μg) purified from samples of the 800 s (line 2) and 1600 s (line 3) cultures are shown. Lines 1 and 4, molecular weight marker.

with 0.2 mL min^{-1} of binding buffer and the sample was loaded. The column was washed with at least 20 column volumes of binding buffer. The antibody was step eluted

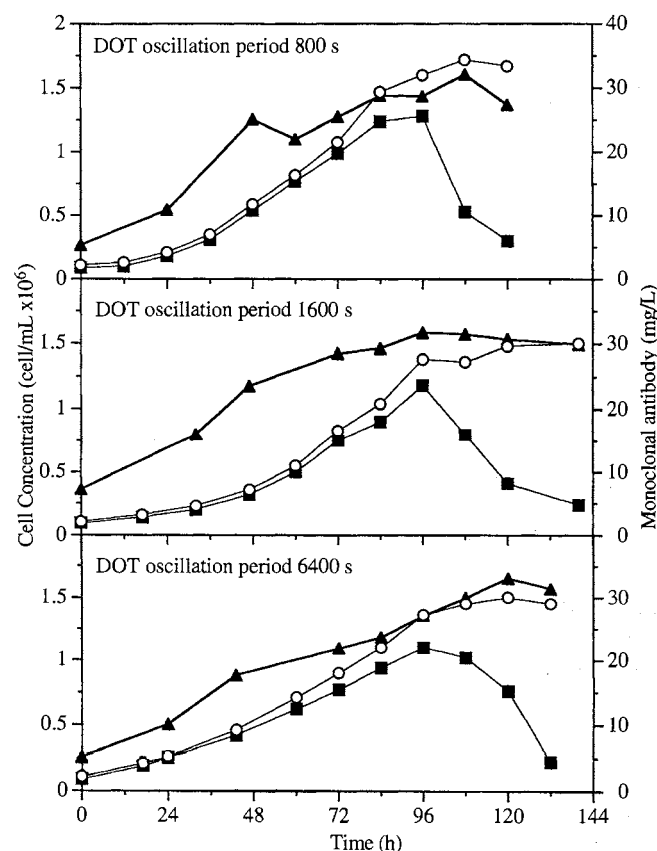


Figure 4. Cell growth and MAb production kinetics in typical cultures at the various DOT oscillating periods. Viable (\blacksquare) and total (\circ) cell concentrations. Monoclonal antibody concentration (\blacktriangle). MAb was assayed once daily for the first 3 days and twice daily for the remaining culture time.

with 0.1 M glycine-HCl, pH 2.7, and received in tubes containing 1 M Tris-HCl, pH 9. Purity of the antibody was assessed with denaturing polyacrylamide gels. Briefly, 2 μg of purified antibody were boiled for 5 min in a reducing buffer (200 mM Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 0.4% bromophenol blue, 40% glycerol, and 1% 2- β -mercaptoethanol) and loaded in 12% SDS-polyacrylamide gels. No protein bands were detected besides those of the heavy and light antibody chains (see Fig. 3). Purified antibody (100 μg) was denatured with 2% SDS and 1 M 2- β -mercaptoethanol and N-glycans were released by digestion for 18 h at 37°C with 1 U PNGase F from *Chryseobacterium meningosepticum* (Calbiochem, San Diego, CA). It has been previously reported that the MAb produced does not have any potential glycosylation sites on the Fab region (Selisko et al., 1999), so all glycans analyzed corresponded to the two glycosylation sites in the Fc region; 0.1 nmol of maltose was added to each sample as an internal control. Glycans were labeled with 2-aminobenzamide with the Signal 2AB labeling kit as described by the manufacturer (Glyko, San Leandro, CA) and separated by HPLC with a GlycoSep N column (Glyko) utilizing a gradient with acetonitrile and 25 or 250 mM ammonium formate, pH 4.4, as described by Guile et al. (1996). Glycans were detected with a Waters

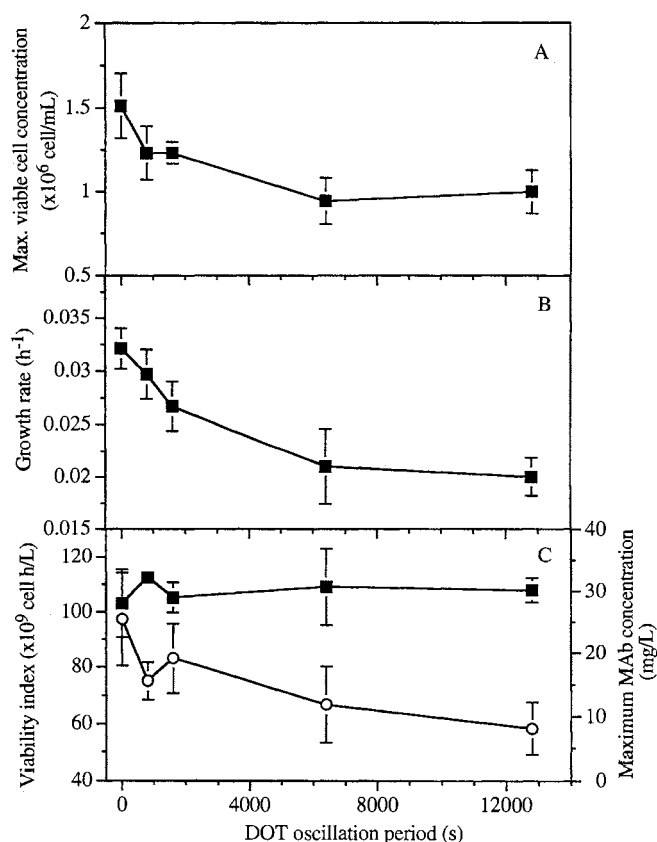


Figure 5. Effect of DOT oscillation period on (A) maximum viable cell concentration; (B) growth rate; and (C) viability index (\circ) and maximum MAb concentration (\blacksquare). Mean values and standard deviations between triplicate experiments are shown. In some cases, error bars are smaller than symbols. Data at 0 s correspond to control cultures at constant (10%) DOT.

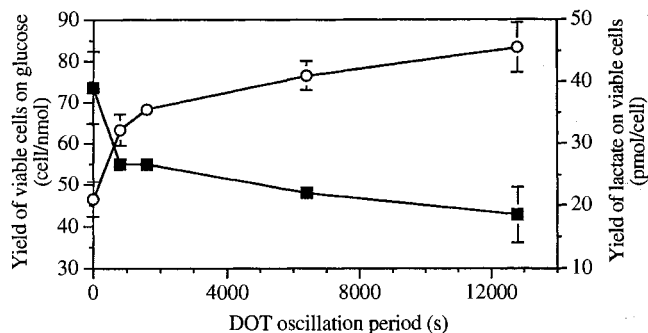


Figure 6. Effect of DOT oscillation period on yield of cells on glucose (■) and yield of lactate on cells (○) at the different oscillation periods tested. Mean values and standard deviations between triplicate experiments are shown. In some cases, error bars are smaller than symbols. Data at 0 s correspond to control cultures at constant (10%) DOT.

2475 (Waters Corporation, Milford, MA) fluorescence detector exciting at a wavelength of 330 nm and measuring emission at 420 nm. A glucose homopolymer standard (Glyko) was utilized to assign glucose units to elution times by fitting data from a standard chromatogram to a polynomial equation, as described by Guile et al. (1997). Chromatograms were integrated utilizing the Millennium 32 software (Waters Corporation). The amount of glycans is reported as percentage of the total amount detected excluding the area of the maltose (internal standard) peak. Structures were proposed for each peak based on their migration in glucose units and susceptibility to individual exoglycosidase digestions. Glycans obtained from 3 µg of purified antibody were digested for 18 h at 37°C. The exoglycosidases used were jack bean meal α-mannosidase (1.2 U), bovine testes β-galactosidase (1.2 mU), jack bean meal β-N-acetylhexosaminidase (50 mU), bovine kidney α-fucosidase (20 mU), and sialidase I (12 mU), all from Prozyme (San Leandro, CA). Our previous experience with digestions of oligosaccharide mixtures and standards has shown that in these conditions the efficiency of digestions is close to 100%.

Nomenclature of Oligosaccharides

Monosaccharides are abbreviated as follows: M, mannose; N, N-acetylglucosamine; F, core fucose; G, galactose; S,

sialic acid. Different nomenclature was utilized for complex (terminated in N, G, or S) and mannose-terminated glycans. For complex glycans, the abbreviation A# indicates the number of antennae linked to the N2M3 core, B indicates bisecting N, and G# and S# indicate the number of galactose or sialic acid residues attached to the oligosaccharide. In turn, mannose-terminated glycans of less than three mannose residues (paucimannosidic forms) are abbreviated by listing all the residues that compose them, starting from the reducing end. Glycans with >3 mannose residues are classified as high-mannose glycans and are abbreviated by indicating the number of mannose residues attached to the chitobiose core. Such nomenclature is standard for glycans obtained from antibodies (for an example see Guile et al., 1996, 1997).

Mathematical Considerations

Apparent cell growth rates (μ) were calculated with the Monod equation utilizing viable cell concentrations from the exponential growth phase. The integral of viable cells over time, or viability index, was calculated from the onset of the exponential growth phase as the area under the growth curve, utilizing the parallelogram approximation. Glucose, glutamine, and lactate specific production rates (q_i) were also calculated taking data from the exponential growth phase according to the following equation:

$$q_i = \left(\frac{dS_i/dt}{dX_v/dt} \right) (\mu), \quad (1)$$

where S is the concentration of nutrient or metabolite i , X_v is viable cell concentration, and t is time. The MAb specific production rate, q_{MAb} , was calculated as the slope of a plot of MAb versus $\int X_v dt$, as MAb production followed non-growth-associated kinetics described by:

$$q_{MAb} = \frac{MAb - MA_{b0}}{\int X_v dt}, \quad (2)$$

where MAb and MA_{b0} are MAb concentrations at time t and at time 0, respectively.

Statistical significance of differences between cultures was determined only for kinetic and stoichiometric parameters using a two-tailed t -test with an α of 5%.

Table I. Yields, specific consumption, and production rates in cultures at different oscillation period.*

Oscillation period (s)	q_{MAb} (pg/cell h)	Y_{MAb} (pg/cell)	q_{Glc} (pmol/cell h)	q_{Lac} (pmol/cell h)	q_{Gln} (pmol/cell h)
Constant DOT	0.14 ± 0.11	53.5 ± 11	0.44 ± 0.08	0.68 ± 0.09	0.073 ± 0.011
800	0.19 ± 0.04	56.6 ± 9	0.54 ± 0.04	0.96 ± 0.02	0.085 ± 0.011
1,600	0.11 ± 0.01	52.6 ± 9	0.48 ± 0.03	0.93 ± 0.09	0.070 ± 0.005
6,400	0.23 ± 0.01	75.4 ± 33	0.44 ± 0.08	0.86 ± 0.2	0.065 ± 0.014
12,800	0.29 ± 0.11	75.7 ± 19	0.47 ± 0.05	0.91 ± 0.01	0.065 ± 0.005

*Mean values and standard deviations between triplicate independent experiments are shown.

RESULTS

A typical culture maintained at constant DOT is shown in Fig. 1. It can be observed that the control system utilized could maintain DOT at a constant value of $10\% \pm 1\%$ and pH at 7.2 ± 0.2 (Fig. 1A). To maintain pH and DOT at such predetermined values, the inlet gas composition was varied as oxygen demand and acid production of the culture increased (Fig. 1B, D). Accordingly, the percentage of oxygen in the inlet gas increased from 7% to 22% as the culture progressed. Similarly, the flow of CO_2 decreased from 22% to 10%. Culturing hybridoma cells at such a

constant DOT resulted in a maximum viable cell concentration of $1.3 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ (Fig. 1C). Viability remained relatively constant between 88% and 90% until 96 h. Thereafter, viability declined, reaching 35% at 144 h when the culture was suspended. The maximum MAb concentration, 34 mg L^{-1} , was obtained at 100 h and remained constant until the end of the culture. Glucose was consumed throughout the culture but was not depleted (Fig. 1D). Lactate was continuously produced until 120 h when it reached a maximum concentration of 30 mM that remained relatively constant until the end of the culture. A yield of 1.6 mol lactate/mol glucose (assuming that lactate was only

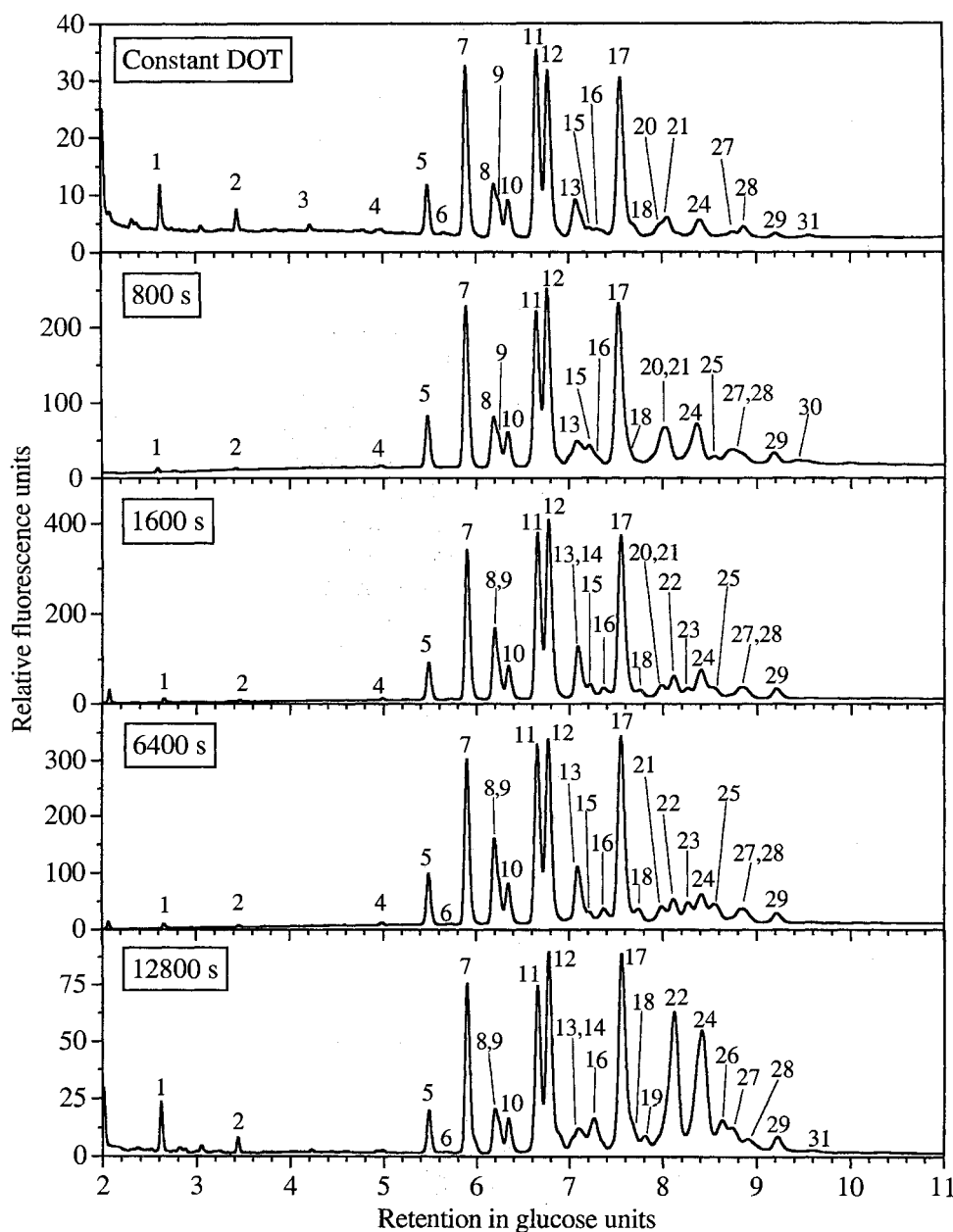


Figure 7. Chromatograms of glycans separated by HPLC at 25 mM of ammonium formate. Oscillation periods are indicated in each panel. Peaks listed in Table I are identified in each chromatogram. It should be noted that some peaks may not appear in both replicate samples (see Table II). Retention times were converted to glucose units according to migration of a glucose homopolymer standard.

Table II. Proposed structures of oligosaccharides N-linked to the MAb produced under different DOT oscillation periods.*

Peak	GU	Proposed structure	% of glycan structures at different oscillation periods (s)				
			0	800*	1,600*	6,400	12,800
1	2.63	N2M	3.6	3.1 ± 2.8	0.4 ± 0.1	0.3	2.6
2	3.44	N2FM2	1.7	1.6 ± 1.5	0.1 ± 0.0	0.1	0.7
3	4.22	N2M3	0.4	0.4 ± 0.4	0.0	0.0	0.0
4	4.98	N2FM3	0.5	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.2	0.0
5	5.48	A2G0	4.4	4.0 ± 0.3	3.4 ± 0.0	4.0	2.4
6	5.66	A2BG0	0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.1	0.1
7	5.90	A2FG0	15.8	12.7 ± 1.3	14.0 ± 0.3	13.3	10.4
8	6.20	M5	3.5	3.1 ± 1.1	3.6 ± 2.2	5.5	2.0
9	6.24	A2G1(1,6) [#]	3.7	2.6 ± 0.8	3.5 ± 1.5	3.0	1.7
10	6.35	A2G1(1,3) [#] or A2BG1(1,6) [#]	3.6	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.3	3.4	2.2
11	6.66	A2FG1(1,3) [#] or A2FBG1(1,6) [#]	17.3	14.7 ± 1.5	14.2 ± 0.9	14.4	10.2
12	6.78	A2FBG1(1,3) [#]	16.0	16.3 ± 0.4	16.9 ± 0.6	15.8	12.9
13	7.08	A2G2S1	2.5	1.3 ± 0.5	2.9 ± 0.7	1.4	1.6
13	7.08	M6	2.1	1.4 ± 0.7	1.1 ± 1.1	4.4	0.0
14	7.10	A2G2	0.0	1.4 ± 1.4	0.9 ± 0.9	0.0	1.3
15	7.21	A2BG2	0.6	1.0 ± 1.0	1.5 ± 0.2	1.0	0.0
16	7.30	A2G2S1	0.6	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.5	1.7	1.2
16	7.30	A2FG2	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2
17	7.56	A2FBG2	15.6	14.7 ± 0.2	16.1 ± 0.5	16.3	13.7
17	7.56	A2FG2S1	0.0	0.0	0.9 ± 0.9	0.0	0.0
18	7.68	A2BG2S1	0.7	4.2 ± 2.3	0.5 ± 0.5	1.4	1.4
19	7.81	A2G2S2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
20	7.99	M7	0.8	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.0	0.0
21	8.06	A2FBG2S2	2.2	3.2 ± 1.9	2.9 ± 2.9	1.7	0.0
22	8.12	M7	0.0	0.0	0.6 ± 0.6	0.0	5.1
22	8.12	A2FBG2S2	0.0	0.0	0.6 ± 0.6	2.2	7.7
23	8.27	A2FG2S2	0.0	0.0	0.5 ± 0.5	1.9	0.0
24	8.40	A2FBG2S2	1.3	2.5 ± 0.7	2.4 ± 0.1	0.0	7.5
24	8.40	M7	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0
24	8.40	A3G3	0.7	1.5 ± 1.0	2.4 ± 1.2	1.1	4.9
25	8.56	M8	0.0	0.0	0.6 ± 0.6	0.0	0.0
25	8.56	A3G3S1	0.0	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.3	2.0	0.0
26	8.64	A3FG3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
26	8.64	A3G3S3	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3
27	8.74	A3FG3S2 or A3BG3S2	0.5	1.3 ± 0.8	1.2 ± 1.2	0.0	1.8
27	8.74	M8	0.0	0.7 ± 0.7	0.6 ± 0.6	1.7	0.0
28	8.87	A3G3S2	0.9	0.2 ± 0.2	1.0 ± 1.0	0.5	1.3
29	9.20	A3FBG3S1 or A3G3S2	0.3	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0.9	1.2
30	9.43	M9	0.0	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.0	0.0
31	9.57	A3FBG3S3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2

*Mean and differences between two cultures are shown.

[#]Numbers in parentheses indicate the antenna to which the G residue is attached. Structures with the same composition but different migration times are isomers.

produced from glucose) was obtained. Glutamine was consumed until it was exhausted at 96 h. Cell growth ceased and viability rapidly declined after glutamine depletion.

To illustrate the effect of oscillatory DOT on hybridoma growth, kinetics of a culture submitted to the longest oscillation period tested, 12,800 s, are shown in Fig. 2. It should be noted that simulation of DOT gradients in animal cell cultures was a completely new challenge compared with our previous work on bacterial and low eukaryotic cultures (Cortés et al., in press; Trujillo-Roldán et al., 2001). First, the slow response time (one order of magnitude slower than in the previous models) required the redesign of the control system and algorithm. In addition, geometry of the tank was modified and another impeller was utilized to

increase the k_{La} . Furthermore, the use of CO₂ to control pH required the introduction of new control subroutines in the computerized program used to maintain constant the partial pressure of CO₂ regardless of changes in total gas flow. It can be observed that the proposed strategy for simulating DOT gradients resulted in the desired oscillatory DOT profile with the predetermined amplitude, axis, and period (see Materials and Methods). Desired oscillation profiles were obtained for periods of 800 s or longer, whereas for periods below 800 s decreasing wave amplitudes were obtained due to the characteristic slow response time of the system (see Materials and Methods).

As in control cultures, pH was maintained at 7.2 ± 0.2 , at least until maximum cell concentration was attained

(Fig. 2). Growth under oscillating DOT with a period of 12,800 s resulted in a maximum viable cell concentration of 0.85×10^6 cell mL⁻¹, while viability remained between 80% and 90% during the first 84 h of culture. Between 108 and 120 h, cell growth ceased and viability rapidly declined to 18% at 136 h, when the culture was terminated. Glucose and glutamine were continuously consumed until 120 h, but residual concentrations of 1.1 and 0.25 mM, respectively, still remained until the end of the culture. Lactate was steadily produced until 120 h, when it reached a concentration of 50 mM. The yield of lactate on glucose was 2 mol mol⁻¹, assuming that all lactate was produced from glucose. MAb concentration increased throughout the culture and reached a maximum of 29 mg L⁻¹.

Typical cell growth and MAb accumulation kinetics at other oscillation periods are shown in Fig. 4. Overall trends were similar to cultures shown in Figs. 1 and 2. It can be observed that lower viable cell concentrations were obtained as the oscillation period increased. The effects of oscillatory DOT conditions on hybridoma growth and metabolism for all cultures conducted are summarized in Figs. 5 and 6 and Table I. Maximum viable cell concentration decreased 38% when cells were subjected to DOT oscillations with a period of 6,400 s or longer, compared to constant (10%) DOT control cultures (Fig. 5A). Likewise, the growth rate decreased from 0.032 h⁻¹ at constant DOT to 0.021 h⁻¹ when DOT was oscillated at a period of 6,400 s (Fig. 5B). However, only in cultures oscillated at 6,400 and 12,800 s, the maximum viable cell concentration and growth rate were significantly different ($\alpha = 5\%$) to cultures at constant DOT. Viability index was only significantly different to control cultures when DOT was oscillated with a period of 12,800 s (Fig. 5C). In contrast, no significant difference in maximum MAb concentration or specific production rate was observed between cultures at constant or oscillating DOT for all periods tested (Fig. 5C, Table I). An increasing trend was observed in the specific MAb yield as the oscillation period increased; however, no significant difference between the conditions tested was found (Table I). Although no significant difference was observed in glutamine consumption rates at the different conditions tested, a declining trend in consumption rate can be observed as the oscillation period increased from 0 to 6,400 s (Table I). No significant difference was found in the glucose consumption rate of cultures at constant or oscillating DOT (Table I). However, a significantly different ($\alpha = 5\%$) higher lactate production rate occurred in all cultures at oscillatory DOT, in comparison with control cultures (constant DOT). The lactate production rate increased, on average, 35% when DOT was oscillated, regardless of the oscillation period. Oscillating DOT decreased the yield of cells on glucose from 34% at 800 s to up to 71% at 12,800 s, compared to control cultures (Fig. 6). Furthermore, the yield of lactate on cells increased with the oscillation period from 21 pmol cell⁻¹ at constant DOT to 45.5 pmol cell⁻¹ at the longest oscillation period.

The glycosylation profiles of MAb produced at different culture conditions were determined. Samples from duplicate cultures oscillated at 800 and 1,600 s oscillation periods were individually analyzed, while, due to experimental limitations, only single cultures at constant DOT

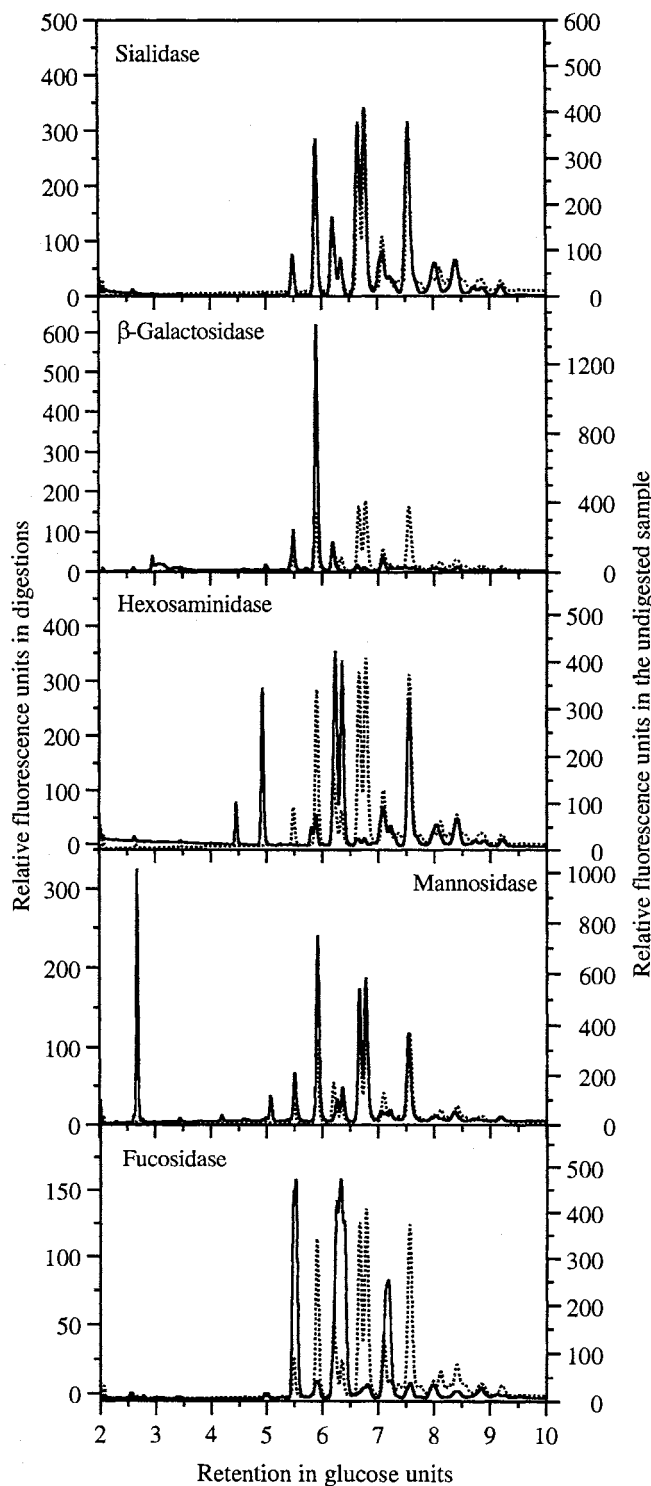


Figure 8. Exoglycosidase digestions of a sample from a culture oscillated with a period of 1,600 s. Solid lines represent digestions and dashed lines the undigested sample. Fluorescence units are scaled relative to the largest unaffected peak upon exoglycosidase treatment.

and 6,400 and 12,800 s oscillation periods were assayed. The chromatograms obtained from the separation of glycans at 25 mM of ammonium formate are shown in Fig. 7. To facilitate peak identification, elution times were transformed to glucose units (GU) as described in Materials and Methods. Structures for the obtained peaks were proposed based on their retention in GU (see Table II) and digestions with exoglycosidases (see Fig. 8). Additionally, glycans were separated utilizing 250 mM of ammonium formate (Fig. 9, chromatograms from the 12,800 s sample as an example), which better separates neutral from charged (sialylated) glycans (Guile et al., 1997). In total, 31 peaks were obtained at 25 mM. It is known that different glycan structures can elute at the same GU values (Guile et al., 1996, 1997; Takahashi and Tomiya, 1992). Exoglycosidase digestions allowed the resolution of at least 40 structures, of which at least 17 co-migrated. The percentage of each proposed structure at each of the oscillation periods tested is listed in Table II, where co-migrating structures are indicated with the same peak number. When two structures were identified for one peak but could not be differentiated by exoglycosidase digestions, both possibilities were listed in the same line in Table II (peaks 10, 11, 27, and 29). Proposed structures are depicted in Fig. 10. Notice that structures with the same composition but different migration times are isomers, as shown in Fig. 10 and previously documented by Takahashi and Tomiya (1992). No difference in the number of structures identified at each culture condition was found. To facilitate result analysis, glycan structures were classified as paucimannosidic, high mannose, G0 (no galactose residues attached), G1, G2, G3, and sialylated. The percentages of each of these groups are listed in Table III. Galactosylated and sialylated structures comprised 68–77% of the total oligosaccharide content, with a predominance of G1 structures, that accounted for 40–27% of total glycans. To visualize the effect of oscillating DOT on MAb glycosylation, species that increased or decreased as the oscillation period increased are grouped

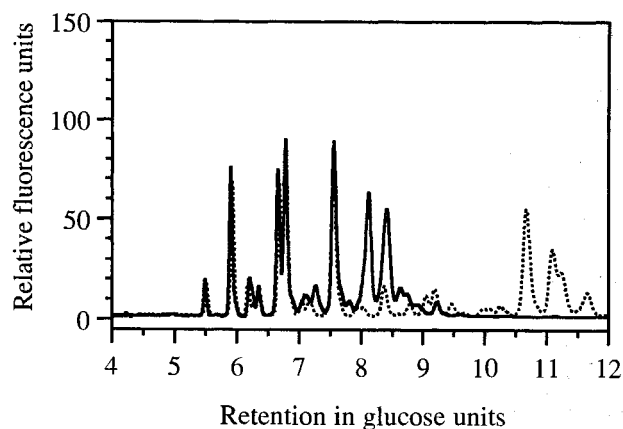


Figure 9. Comparison between chromatograms obtained at 25 mM (solid line) and 250 mM (dashed line) of ammonium formate. Chromatograms of glycans from MAb produced at a 12,800-s oscillation period are shown.

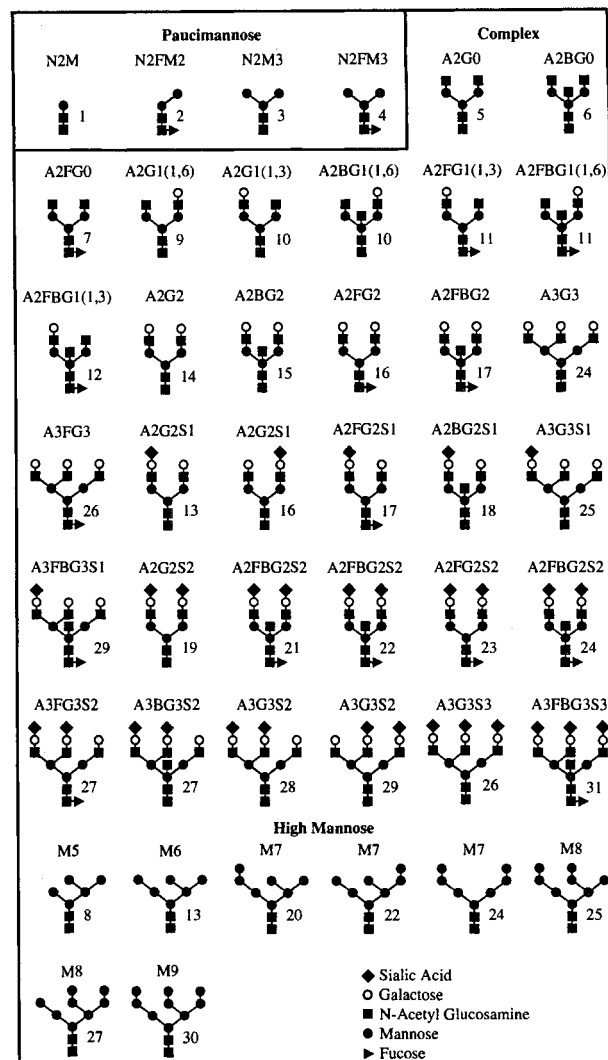


Figure 10. Representation of the structures proposed in Table II. Numbers in parentheses indicate the antenna to which the G residue is attached. Structures with the same composition but different migration times are isomers. Structures are grouped according to their composition and are based on data from Guile et al. (1996, 1997) and Takahashi and Tomiya (1992).

together in Fig. 11. G2 structures are not included in this figure as no significant change in their content was found (Table III). Oscillating DOT decreased the content of

Table III. Characteristic groups of oligosaccharides present in MAb produced under different DOT oscillation periods.

Type of glycan	Constant				
	DOT	800 s ^a	1,600 s ^a	6,400 s	12,800 s
Paucimannose	6.2	5.6 ± 5.0	0.7 ± 0.1	0.6	3.4
High mannose	6.5	7.3 ± 2.8	8.2 ± 3.8	13.5	7.2
G0	20.4	16.9 ± 1.3	17.4 ± 0.3	17.4	12.9
G1	40.8	36.7 ± 2.1	37.5 ± 0.3	36.5	27.0
G2	16.2	17.1 ± 0.2	18.6 ± 0.6	17.2	17.2
G3	0.7	1.5 ± 0.1	2.4 ± 1.8	1.1	5.2
Sialylated	9.2	15.0 ± 2.3	15.2 ± 1.9	13.6	27.4

^aMean and differences between two cultures are shown.

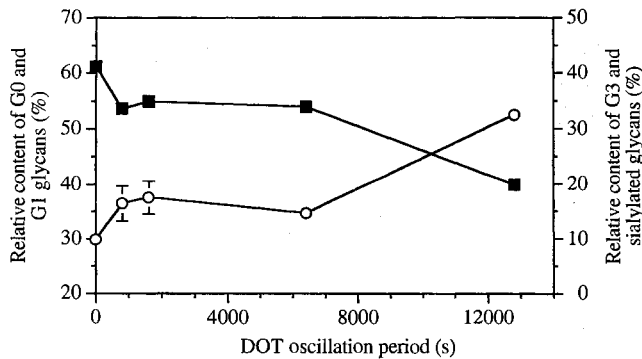


Figure 11. Effect of DOT oscillation period on the relative content of G0 plus G1 and G3 plus sialylated glycans attached to the MAb: G0 plus G1 glycans (■); G3 plus sialylated glycans (○). Cultures oscillated at 800 and 1600 s were analyzed per duplicate, and the rest were single determinations. Differences between duplicates are shown with error bars, which in some cases were smaller than the symbol. Data at 0 s correspond to control cultures at constant (10%) DOT.

G0 plus G1, while G3 plus sialylated glycans increased. Increasing the oscillation period to 12,800 s decreased the percentage of G0 plus G1 glycans by 14%, whereas G3 plus sialylated glycans increased 23%.

DISCUSSION

Scale-down studies have been performed for bacterial and yeast cultures (Cortés et al., in press; Oosterhuis, 1984; Palomares and Ramírez, 2000b; Trujillo Roldán et al., 2001) but are almost inexistent for animal cell cultures. Simulating heterogeneous DOT in large-scale culture conditions through scale-down simulators is especially challenging in the case of animal cells. Their fragility impedes the use of high gas sparging or agitation rates. Thus, animal cell bioreactors have high system response times and low mass transfer coefficients that limit the simulation of rapid circulation times. Here, this problem was partially solved by utilizing a very low liquid height-to-tank diameter ratio in a surface-aerated bioreactor. With this configuration, an oscillation period (800 s) in the same order of magnitude than circulation times predicted for air-lift reactors [50–250 s by Doran (1993)] could be obtained. With such a simulated circulation time, the effect of heterogeneous DOT conditions in the worst-case scenario can be assessed. Interestingly, repeatedly maintaining hybridoma cells at anoxic conditions for over 5 min (800 s) did not have a significant effect on monoclonal antibody concentration, yield, or productivity (Fig. 5, Table I). From the results obtained, it is possible to infer that the effect of lower oscillation periods will be minimal. Accordingly, in an attempt to propose novel low-cost and less harmful/damaging aeration strategies in which oxygen would only be periodically provided to the reactor, higher oscillation periods were assayed.

Oscillating DOT resulted in lower viable cell concentrations, viability indexes and specific growth rates (Fig. 5).

Such effects increased with the oscillation period. Several authors have determined the effect of constant, but not oscillating, DOT on hybridoma growth. A critical oxygen concentration of 1.2% was reported (Ozturk and Palsson, 1990), below which oxygen uptake rate (OUR) decreases. OUR remained unchanged at higher oxygen concentrations, indicating that the respiratory chain is saturated (Ozturk and Palsson, 1990). A K_m of oxygen for hybridoma growth between 0.6% and 0.5% has been calculated (Miller et al., 1987; Ozturk and Palsson, 1990). Ozturk and Palsson (1990) observed a decrease in viable cell concentration below 5% DOT and found that growth rate is reduced at DOT below 10%. It has been reported that an adaptation time in which DOT is gradually decreased is required for cells to survive and even grow under anoxic conditions (Miller et al., 1987; Ozturk and Palsson, 1990). It has also been found that cells subjected to anaerobiosis or very low DOT (<1%) for up to several days can resume normal growth when placed in an oxygen-containing environment (Heidemann et al., 1998; Miller et al., 1988; Ozturk and Palsson, 1990). In hybridoma cultures where DOT was continuously maintained at 0.5% (or at 2% for other cell lines), enhanced viability, growth rate, and life-time have been observed (Hevehan and Miller, 1999; Miller et al., 1987). In contrast to previous studies where the effect of DOT in hybridoma cells was evaluated by maintaining a constant DOT, in this work, cultures remained in a transient state where cells had to continuously adapt to a changing environment. When cells encounter anoxic conditions, allosteric regulation of enzymes takes place almost immediately [10^{-3} to 1 s, in Palomares and Ramírez (2000b)], resulting in reduced growth, shifting to anaerobic glycolysis, and inhibiting protein synthesis (Hevehan and Miller, 1999). If cells remain in DOT limitation, extensive cellular and metabolic re-programming occurs (Hevehan and Miller, 1999). It is unclear how, or if, cells achieve homeostasis during oscillating DOT conditions.

From the results obtained in this work, it was clear that cells could recover from long periods of time at very low DOT (at the 12,800-s oscillation period, cells remained for 102 min at DOT below 5% and for 72 min below the critical DOT of 1.2%) without an adaptation period. Oscillating DOT, similarly to maintaining cells at a constant low DOT, also reduced cell growth. Interestingly, the reduction of growth rate (50%) between the control cultures and those oscillated with periods of 6,400 and 12,800 s (Fig. 5) was equivalent to that observed when Ozturk and Palsson (1991) reduced DOT from 60% to 1%. A high glycolytic activity was observed as the oscillation period increased, as can be concluded from the reduced yield of cells on glucose and the higher yield of lactate on cells (Fig. 6; Table I). Accordingly, it has been previously reported that DOT below 0.5% increased glycolysis (Miller et al., 1988; Ozturk and Palsson, 1990). The yield of lactate over glucose increased 20% when Ozturk and Palsson (1991) decreased DOT from 10% to 1%. We observed the same increase in the yield of lactate between cultures at constant DOT and those oscillated with

a period of 6,400 or 12,800 s. Such results indicate that when cells are subjected to long oscillation periods (6,400 and 12,800 s), they behave as cultures at very low constant DOT. It is possible that long exposure to anoxic conditions maintains the anaerobic metabolism machinery working, even when cells return to high DOT concentrations. It should be noted that cells spend the same amount of time at low (<7%) and high (>7%) DOT. That a significant difference existed between cultures oscillated with different periods indicates that not only exposure of cells to low DOT is of relevance, but also the duration of such an exposure. To our knowledge, only Rhiel and Murhammer (1995) have determined the effect of oscillatory DOT on animal cells. They also observed a reduction in maximum cell concentration, growth rate, and recombinant protein concentration when insect cells were subjected to step changes between 0 and 15% DOT. In their case, only one oscillation period of approximately 4,440 s was tested.

The higher lactate production rate and maximum concentration in cultures at oscillating DOT was not accompanied with an increase in glucose or glutamine consumption rates. The glucose consumption rate remained unchanged at the different oscillation periods tested, while the Gln consumption rate slightly decreased (Table I). The slight decrease in Gln consumption rate observed in oscillated cultures agrees with results from Zupke et al. (1995), who observed a decrease in glutamine consumption in cultures at DOT of 1% and 0%, compared to cultures at 60%. They observed a specific Gln consumption rate at 0% DOT of $0.06 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$, very similar to that obtained in this work at oscillation periods of 6,400 and 12,800 s. Miller et al. (1987) determined the effect of DOT changes in continuous cultures, and found that glutamine consumption is limited by DOT below 0.4%. Moreover, they observed that glutamine uptake initially decreased upon a step change in DOT and thereafter increased (Miller et al., 1988). A declining trend in the Gln consumption rate observed in our work as the oscillation period increased probably indicates that cells remained in a transitional state to which they could not fully adapt.

Interestingly, the same amount of monoclonal antibody was produced regardless of oscillating DOT (Fig. 5). This result contrasts with reports by Ozturk and Palsson (1990, 1991) and Miller et al. (1987), who observed a decrease in MAb concentration as DOT was decreased below 10%. Such a different behavior in constant and oscillating DOT conditions differs with observations regarding cell growth and metabolism, and reflects fundamental differences between the regulatory mechanisms of primary metabolism and MAb synthesis. Although no significant differences in specific MAb production rate and yield were observed with increasing DOT oscillation period, an increasing trend was observed in both parameters (Table I). Such an increase reflects the decrease observed in maximum cell concentration in oscillated cultures.

From the overall kinetic and stoichiometric results, a precipitous conclusion would have indicated that hybrid-

omas could be cultured without a strict control of DOT. For instance, no detriment to the overall culture performance would be expected by using intermittent aeration, and control strategies with frequencies even in the order of hours could be acceptable in terms of final MAb concentration. However, analysis of the glycan structure revealed that even though the studied environmental parameter had little or no effect on some of the macroscopic variables determined (Figs. 5 and 6; Table I), important differences on fundamental subtle protein characteristics occurred. Glycan structures detected in MAb produced at 10% DOT were those typical of IgG antibodies (Guile et al., 1996; Saba et al., 2002). Nonetheless, atypical triantennary and sialylated forms increased as the oscillation period was increased (Table II). Clearly, subjecting hybridomas to long periods of anoxia changed the glycosylation of the produced MAb. Several effects have been observed when cultures were subjected to DOT around 50% compared to cultures at 10% DOT. Kunkel et al. (1998) observed a decrease in galactosylated forms at 10% DOT, but no effect on maximum MAb concentration. Chotigeat et al. (1994) observed a decrease in in vitro-measured sialyltransferase activity at 10% DOT. Previous studies, where the effect of DOT on glycosylation was assessed, attributed changes in glycosylation to a lack of sugar nucleotide precursors due to an energetic limitation under oxygen privation (Kunkel et al., 1998). However, since we observed an increase in the extent of glycan processing, as evidenced from an increased G3 and sialylated forms (Table III), such a limitation did not exist at oscillating DOT. To our knowledge, the effect of DOT below 10% on IgG glycosylation has not been investigated.

A possible explanation for the higher amount of G3 plus sialylated glycans in MAb produced at high oscillation periods is that the structure of the antibody was modified. One of the first effects of environmental stress is inefficient protein folding, which is counterbalanced by upregulation of heat shock proteins and others (Palomares et al., 2004). MAb contains 16 disulfide bonds that are crucial for their correct conformation (Goding, 1986). It is known that anoxic conditions provoke changes in the intracellular redox potential, to which the cells usually adapt by modifying the equilibrium of reduced and oxidized species (Hevehan and Miller, 1999). However, it is not known if homeostasis in redox potential is achieved under oscillating DOT. Normally, the oligosaccharide is immobile between the C_H2 domains of the antibody in close interaction with surrounding amino acids (Lund et al., 1996), where it is not accessible to sialyltransferases (Jassal et al., 2001). Thus, it is possible that the increase in sialylated and G3 forms as the oscillation period increased was due to an inefficient folding of the MAb that allowed glycans to be accessible to glycosyltransferases. Supporting this hypothesis, Jassal et al. (2001) suggested that sialylation is controlled primarily by the protein structure local to the carbohydrate. Moreover, Mattu et al. (1998) observed that IgA1 is more extensively glycosylated and sialylated than IgG, probably because in

the former glycans are not confined to the inter-chain space. That the increase in G3 and sialylated glycans was at expense of G0 and G1 glycans can be explained as agalactosylated forms of IgG are more mobile than galactosylated forms (Ghirlando et al., 1999), which may increase their availability to glycosyltransferases.

CONCLUSIONS

A scale-down simulator specific for animal cells was designed and used to determine the effect of spatial DOT heterogeneities on hybridoma culture and MAb production. It was shown that oscillating DOT conditions reduced cell growth and increased glycolysis. However, maximum MAb concentration remained unchanged up to oscillation periods of 12,800 s, compared to control cultures maintained at 10% constant DOT. When the N-glycosylation profile of the antibody produced was analyzed, an increase of sialylated and G3 glycans was observed as the oscillation period increased above 6,400 s. Such an increase was at the expense of G0 and G1 forms. G3 and sialylated glycoforms can decrease effector functions and result in immunogenic reactions (Jassal et al., 2001; Jefferis et al., 1998; Wright and Morrison, 1997). These results underline the importance of adequate scale-up strategies for obtaining desirable MAb glycoforms. To our knowledge, this is the first time that the effect of oscillatory DOT on hybridoma growth and MAb glycosylation has been determined. We also provided evidence on how environmental heterogeneities, a prevalent problem of large-scale animal cell cultures, can affect relevant physiologic and metabolic aspects of hybridomas as well as the quality of a glycoprotein. Understanding the effect of oscillatory DOT on cell growth and MAb glycosylation is important for the development of production processes, as operations must be constrained to conditions where no relevant adverse effects occur.

Technical assistance by V. Hernández, K. Levy, S. Ainsworth, and J. Dorantes is acknowledged.

References

- Birch JR. 2000. Cell products—antibodies. In: Spier R, editor. Encyclopedia of cell technology. New York: John Wiley & Sons. p 411–423.
- Chotigeat W, Watapokasin Y, Mahler S, Gray PP. 1994. Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. *Cytotechnol* 15:217–221.
- Cortés G, Trujillo-Roldán MA, Ramírez OT, Galindo E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. *Process Biochem* (in press).
- Doran PM. 1993. Design of reactors for plant cells and organs. In: Fiechter A, editor. Advances in biochemical engineering/biotechnology. Berlin: Springer-Verlag. Vol 48, p 115–168.
- Garnier A, Voyer R, Tom R, Perret S, Jardin B, Kamen A. 1996. Dissolved carbon dioxide accumulation in a large-scale and high-density production of TGF β receptor with baculovirus infected Sf-9 cells. *Cytotechnol* 22:53–65.
- Ghirlando R, Lund J, Goodall M, Jefferis R. 1999. Glycosylation of human IgG-Fc: influences on structure revealed by differential scanning micro-calorimetry. *Immunol Lett* 68:47–52.
- Goding JW. 1986. Monoclonal antibodies: principles and practice. Orlando, FL: Academic Press. p 5–58.
- Gray DR, Su C, Howarth W, Inlow D, Maiorella BL. 1996. CO₂ in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture. *Cytotechnol* 22:65–78.
- Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA. 1996. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal Biochem* 240:210–226.
- Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Dwek RA. 1997. HPLC strategies for profiling and sequencing oligosaccharides. In: Jackson P, Gallagher JT, editors. A laboratory guide to glycoconjugate analysis. *BioMethods*. Basel: Birkhäuser Verlag. Vol 9, p 199–234.
- Heidemann R, Lütkemeyer D, Büntemeyer H, Lehmann J. 1998. Effects of dissolved oxygen levels and the role of extra- and intracellular amino acid concentrations upon the metabolism of mammalian cell lines during batch and continuous cultures. *Cytotechnol* 26:185–197.
- Hevehan DL, Miller WM. 1999. Hypoxia, effects on animal cells. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. Encyclopedia of bioprocess technology, fermentation, biocatalysis and bioseparation. New York: John Wiley & Sons. p 1418–1433.
- Higareda AE, Possani LD, Ramírez OT. 1994. Metabolic and kinetic studies of hybridomas in exponentially fed-batch cultures using T-flasks. *Cytotechnol* 15:73–86.
- Hu WS, Aunins JG. 1997. Large-scale mammalian cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 8:148–153.
- Jan DCH, Petch DA, Huzel N, Butler M. 1997. The effect of dissolved oxygen on the metabolic profile of a murine hybridoma grown in serum-free medium in continuous culture. *Biotechnol Bioeng* 54:153–164.
- Jassal R, Jenkins N, Charlwood J, Camilleri P, Jefferis R, Lund J. 2001. Sialylation of human IgG-Fc carbohydrate by transfected rat α 2,6-sialyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 286:243–249.
- Jefferis R, Lund J, Pound JD. 1998. IgG-Fc mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev* 163:59–76.
- Kunkel JP, Jan DCH, Jamieson JC, Butler M. 1998. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol* 62:55–71.
- Kunkel JP, Jan DCH, Butler M, Jamieson JC. 2000. Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors. *Biotechnol Prog* 16:462–470.
- Langheinrich C, Nienow AW, Eddleston T, Stevenson NC, Emery AN, Clayton TM, Slater NKH. 1998. Liquid homogenization studies in animal cell bioreactors of up to 8 m³ in volume. *Trans IChemE* 76(C):107–116.
- Lidén G. 2002. Understanding the bioreactor. *Bioproc Biosyst Eng* 24:273–279.
- Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Jefferis R. 1996. Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fc γ receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains. *J Immunol* 157:4963–4969.
- Ma S, Nashabeh W. 1999. Carbohydrate analysis of a chimeric recombinant monoclonal antibody by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem* 71:5185–5192.
- Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, Kilian M, Wormald MR, Lellouch AC, Rudd PM, Woof JM, Dwek RA. 1998. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc α receptor interactions. *J Biol Chem* 273:2260–2272.
- Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. 1987. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *J Cell Physiol* 132:524–530.

- Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. 1988. Transient responses of hybridoma metabolism to changes in the oxygen supply rate in continuous culture. *Bioproc Eng* 3:103–111.
- Mimura Y, Church S, Ghirlando R, Ashton PR, Dong S, Goodall M, Lund J, Jefferis R. 2000. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol Immunol* 37:697–706.
- Nienow AW, Langheinrich C, Stevenson NC, Emery AN, Clayton TM, Slater NKH. 1996. Homogenization and oxygen transfer rates in large agitated and sparged animal cell bioreactors: some implications for growth and production. *Cytotechnol* 22:87–94.
- Ogawa T, Kamihira M, Yoshida H, Iijima S, Kobayashi T. 1992. Effect of dissolved oxygen concentration on monoclonal antibody production in hybridoma cell cultures. *J Ferment Bioeng* 74:372–378.
- Oosterhuis NMG. 1984. Scale-up of bioreactors, a scale-down approach. Ph.D. thesis. Delft, The Netherlands: Delft University of Technology.
- Ozturk SS. 1996. Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnol* 22:3–16.
- Ozturk SS, Palsson BO. 1990. Effect of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotechnol Prog* 6:437–446.
- Ozturk SS, Palsson BO. 1991. Growth, metabolic and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnol Prog* 7:481–494.
- Palomares LA, Ramírez OT. 2000a. Bioreactor scale-up. In: Spier RE, editor. *Encyclopedia of cell technology*. New York: Wiley Interscience. p 183–201.
- Palomares LA, Ramírez OT. 2000b. Bioreactor scale-down. In: Spier RE, editor. *Encyclopedia of cell technology*. New York: Wiley Interscience. p 174–183.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. In: Balbás P, Lorence A, editors. *Recombinant gene expression protocols*. Totowa, NJ: Humana Press 267:15–51.
- Rhiel M, Murhammer DW. 1995. The effect of oscillating dissolved oxygen concentrations on the metabolism of a *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE clonal isolate. *Biotechnol Bioeng* 47:640–650.
- Saba JA, Kunkel JP, Jan DCH, Ens WE, Standing KG, Butler M, Jamieson JC, Perrault H. 2002. A study of immunoglobulin G glycosylation in monoclonal and polyclonal species by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 304:16–31.
- Schmelzer AE, Miller WM. 2002. Hyperosmotic stress and elevated pCO_2 alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. *Biotechnol Prog* 18:346–353.
- Selisko B, Licea AF, Becerril B, Zamudio F, Possani LD, Horjales E. 1999. Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Proteins* 37:130–143.
- Shi Y, Ryu DDY, Park SH. 1993. Monoclonal antibody productivity and the metabolic pattern of perfusion cultures under varying oxygen tensions. *Biotechnol Bioeng* 42:430–439.
- Takahashi N, Tomiya N. 1992. Analysis of N-linked oligosaccharides: application of glycoamidase A. In: Takahashi N, Miramatsu T, editors. *Handbook of endoglycosidases and glycoamidases*. Boca Raton, FL: CRC Press. p 199–332.
- Tramper J, Vlask JM, De Gooijer CD. 1996. Oxygen gradients in small and big sparged insect-cell bioreactors. *Cytotechnol* 20:231–238.
- Trujillo-Roldán MA, Peña C, Ramírez OT, Galindo E. 2001. Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol Prog* 17:1042–1048.
- Varley J, Birch J. 1999. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnol* 29:177–205.
- Wright A, Morrison SL. 1997. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* 15: 26–32.
- Zamudio F, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Herion P, Possani LD. 1992. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur J Biochem* 204: 281–292.
- Zupke C, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. 1995. Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen in hybridomas. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:27–36.

Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media

J. Antonio Serrato, Vanessa Hernández, Sandino Estrada-Mondaca¹, Laura A. Palomares and Octavio T. Ramírez²

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal. 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62250, Mexico

SFM (serum-free medium) is preferred to media containing animal-derived components when culturing mammalian cells for the production of therapeutic recombinant proteins and mAbs (monoclonal antibodies). Nonetheless, eliminating animal-derived components from media can strongly modify culture performance and alter protein glycosylation. In the present study, mAb glycosylation profiles, extracellular exoglycosidase activities, hybridoma growth and mAb production in traditional medium containing 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum) [DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/FBS] were compared with those obtained in either SFM or CDM (chemically defined medium). SFM and CDM supported higher cell and mAb concentrations than did DMEM/FBS; however, CE (capillary electrophoresis) analyses revealed important changes in mAb glycosylation patterns. Glycosylation patterns showed a broad microheterogeneity in all the media, ranging from complex to high-mannose and paucimannosidic glycans. mAb produced in DMEM/FBS presented 26 glycan structures, whereas a lower glycan microheterogeneity was found for cultures in CDM or SFM, which presented 24 and 22 structures respectively. In DMEM/FBS and CDM, complex glycans without terminal galactose (G₀) represented 28 and 32% of the total glycans respectively and 42 and 46% corresponded to galactosylated structures (G₁ plus G₂) respectively. In contrast, G₀ glycans in SFM accounted for 58%, whereas only 28% corresponded to G₁ and G₂ structures. Extracellular β -galactosidase activity increased approx. 3-fold in SFM, which can explain the higher G₀ content compared with cultures in the other two media. A desirable decrease in sialylated structures, but an undesirable increase in fucosylated forms, was observed in mAb produced in SFM and CDM media. Approx. 80% of potential mAb glycosylation sites were occupied, regardless of the culture medium used.

Introduction

Since the introduction of hybridoma technology, mAbs (monoclonal antibodies) have been used extensively as *in vivo* and *in vitro* diagnostic reagents and as ligands for efficient purification of biomolecules. As of 2005, a total of 31 mAb-based products had been accepted for human therapy or *in vivo* diagnostics and many more are now in clinical trials [1,2]. Optimal growth of hybridoma cells is generally achieved in a defined basal medium containing relatively high levels of FBS (fetal bovine serum) (5–10%, v/v). Nonetheless, a well-defined production process, in which sera and proteins of any origin are preferably omitted from the medium formulation, is fundamental to manufacture highly purified mAb of consistent quality. CDM (chemically defined media) offer the advantage of lot-to-lot consistency and reduced dependence on animal or plant components whose supply can be uncertain. Furthermore, CDM facilitate downstream processing and regulatory approval (<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm#97>) and can improve product biosafety by reducing the risk of contamination by adventitious agents [3–6]. In the last decade, hybridoma and myeloma cell lines have been successfully adapted to grow in SFM (serum-free media), protein-free media or CDM, with the concomitant selection for improved cell densities and mAb yields [7–11].

Keywords: chemically defined medium, exoglycosidase, glycosylation, metabolism, monoclonal antibody, serum-free medium

Abbreviations used: ADCC, antibody-dependent cell cytotoxicity; APTS, 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid; CDM, chemically defined medium; CE, capillary electrophoresis; CHO cells, Chinese-hamster ovary cells; CPA, corrected peak area; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GU, glucose unit; mAb, monoclonal antibody; 4-MU, 4-methylumbelliferyl; SFM, serum-free medium; UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México

¹ Present address: Grupo de Medicina Regenerativa, Unidad de Ingeniería de Tejidos y Terapia Celular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud, Av. México-Xochimilco 289, Arenal de Guadalupe, Tlalpan, CP 14389, México, DF, México.

² To whom correspondence should be addressed (email tonatiuh@ibt.unam.mx).

Quality and consistency require reproducible glycosylation of mAbs, but there is relatively little information about the impact of SFM or CDM on the glycosylation pattern of mAbs produced by hybridoma or myeloma cultures [12–14].

IgGs are symmetrical molecules composed of two pairs of identical heavy and light chains that together form three globular protein moieties: two identical Fab responsible for antigen binding and the Fc responsible for effector functions [15]. Mammalian IgGs have a highly conserved N-glycosylation site at Asn²⁹⁷ within the CH₂ domain of the Fc heavy chain [16,17]. The IgG glycosylation pattern has been characterized by several groups [18–24]. In general, the more abundant oligosaccharide groups in IgG mAbs are asialo biantennary complex-type glycans, primarily agalactosylated (G0), monogalactosylated (G1) or bigalactosylated (G2) types. Most are fucosylated at position 6 of the innermost GlcNAc (N-acetylglucosamine) in the chitobiose core. Bisecting GlcNAc can be present in some cases [25,26].

The glycosylation pattern of an IgG can influence both its biological function and its physicochemical properties. For instance, alterations in glycan profiles can affect IgG structural integrity, abolish or minimize protease resistance and interfere with activation of the C1q component of complement and with the binding to Fc γ -receptors during the ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity) response [27–35]. The latter effect is of particular concern when mAbs are intended for therapeutic use.

Several environmental factors can alter mAb glycosylation. For example, Serrato et al. [24] showed that a fluctuating dissolved oxygen tension modified the glycosylation pattern of a murine mAb. Likewise, the media and mode of culture can determine mAb glycosylation patterns [25,36–38]. An example of a qualitative difference is that sialylated glycans were undetectable when a murine IgG1 was produced in ascites, whereas an intermediate and high sialic acid content were observed for hybridomas cultured in serum-supplemented media and SFM respectively [39]. Additionally, the IgG obtained from serum-containing cultures had a lower molar content of terminally galactosylated oligosaccharides, compared with the other two production conditions. Lively et al. [40] found the same types of glycan structures on CAMPATH-1HTM mAb expressed by CHO (Chinese-hamster ovary) cells in a hollow-fibre bioreactor using 5% serum-supplemented medium and in a stirred 8000 litre bioreactor using SFM. However, a higher proportion of glycans had terminal galactose residues when cells were grown in serum-containing medium compared with protein-free medium. Nonetheless, only qualitative data were provided as quantification of relative oligosaccharide content was not performed. Recently, Cabrera et al. [41] observed that mAb glycosylation, produced at low cell concentration in T-75 and spinner flasks, was independent of serum content and had a high degree (~60 and 20%) of gal-

actosylated structures (G1 and G2 respectively). In contrast, high cell concentration systems (hollow fibre and miniPERMTM) displayed a higher galactosylation heterogeneity that was influenced by changes in serum content. The most abundant structures were agalactosylated and core fucosylated glycans. Glycosylation heterogeneity was attributed to secretion of exoglycosidases that reduced G1 and G2 structures, although no exoglycosidase activities were measured.

Given the importance of glycosylation for the functional properties of mAb and the necessity of a well-defined and consistent product production process, here we report a quantitative and extensive analysis by CE (capillary electrophoresis) of the glycosylation profile of an IgG produced by a murine hybridoma cultured in either serum-containing DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM/FBS), SFM or CDM. Some differences in the glycosylation profile were correlated with the activity of extracellular exoglycosidases, providing further insight into the parameters influencing mAb glycosylation. Differential growth, metabolic coefficients and accumulation of extracellular exoglycosidases were also documented.

Materials and methods

Cell line and culture media

The BCF2 hybridoma used in the present study was derived from a Balb/c mouse, and it secretes an IgG1 mAb against toxin 2 of the Mexican bark scorpion (*Centruroides noxius* Hoffmann) [42]. Cells were cultured in three different media: chemically defined hybridoma medium (CDM) (Gibco, Carlsbad, CA, U.S.A.) supplemented with 8 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), serum-free hybridoma medium (SFM) (Gibco) and DMEM/FBS (Sigma) supplemented with 10% FBS (Gibco), 3.7 g · l⁻¹ of sodium bicarbonate, 4.5 g · l⁻¹ of glucose, 4 mM of glutamine and 0.8 mg · l⁻¹ of insulin (all from Sigma).

Cell line adaptation and culture conditions

Cells growing exponentially in DMEM/FBS were easily adapted to grow in CDM and SFM after a single step passage in T-25 flasks with 5 ml of medium and inoculated at 5 × 10⁵ viable cells · ml⁻¹. After few subcultures, cells reached a viability of above 90%; cells were then cryopreserved according to the media manufacturer's instructions. Static suspension cultures were initiated in triplicate using T-75 flasks containing 15 ml of medium and incubated at 37 °C with 5% CO₂ in humidified air. Inocula for all T-75 cell cultures were obtained from exponentially growing cells in T-25 flasks at a cell concentration of approx. 1.5 × 10⁶ cells · ml⁻¹ and viabilities above 90%. All T-75 cultures were seeded at a

concentration of 0.2×10^6 cells \cdot ml⁻¹, and were terminated when viability was below 40%.

Determination of cell, metabolite and mAb concentrations

Cell concentration and viability were determined by Trypan Blue exclusion in a haemocytometer. Glucose, lactate and glutamine concentrations were determined with a biochemical analyser (YSI Instruments, Yellow Springs, OH, U.S.A.). mAb concentration was determined through a sandwich ELISA as described elsewhere [43] and using as standard a purified BCF2 mAb of known concentration.

Protein purification and quantification

mAb collected from culture supernatants was purified with a Protein A-Sepharose column (Amersham Biosciences), and antibody purity was assessed by denaturing PAGE as described by Serrato et al. [24]. The possibility of bovine IgG contamination in DMEM/FBS should be taken into account. Schuler and Reinacher [44] have found that bovine IgG contamination in mAb produced and purified similarly to the present study resulted, at most, in a contamination of 17%. As discussed below, the presence of such levels of bovine IgG did not affect the conclusions of the present study. The protein concentration of purified IgG was determined using the Bradford-based Protein Assay Kit (Bio-Rad), utilizing bovine IgG as the standard.

Glycan analysis

A 100 μ g portion of purified antibody was denatured with 2% (w/v) SDS and 1 M 2-mercaptoethanol; N-glycans were then released from the protein by digestion for 20 h at 37°C with 1 unit of PNGase F (peptide N-glycosidase F) from *Chryseobacterium meningosepticum* (Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.). Maltose (2 nmol) was added to each sample as an IS (internal standard). Proteins were separated from N-glycans by precipitation with cold alcohol followed by alcohol evaporation. Maltose and N-glycans, released from 100 μ g of protein, were derivatized at their reducing end with the charged fluorophore APTS (8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid) according to the eCAP carbohydrate labelling and analysis kit directions from Beckman Coulter (Fullerton, CA, U.S.A.). Briefly, N-glycans were reconstituted in 2 μ l of a 0.2 M solution of APTS in 15% (v/v) acetic acid, followed by addition of 2 μ l of 1 M aqueous sodium cyanoborohydride in tetrahydrofuran. Labelling proceeded for 16 h at 37°C and the reaction was stopped by diluting approx. 125-fold with water.

Labelled carbohydrates were analysed by CE using a Beckman Coulter P/ACE™ MDQ system equipped with a 3 mW argon-ion laser and a LIF (laser-induced fluorescence) detector with a λ_{ex} of 488 nm and a λ_{em} of 520 nm. An eCAP N-CHO capillary (coated capillary with reduced electro-osmotic flow) of 50 μ m internal diameter

and 48.5 cm length (38.5 cm effective length to detector) from Beckman Coulter was used as described by Estrada-Mondaca et al. [45]. Samples were introduced hydrodynamically for 10 s at 3.45 kPa. Separation was performed in reverse polarity (with the anode at the detector) in a constant electric field of 515.4 V \cdot cm⁻¹ at 15°C. The capillary was rinsed between runs with carbohydrate separation buffer-N (cat. no. 477623; Beckman Coulter) at 138 kPa for 2 min.

To relate glycan migration times to GU (glucose unit) values, a glucose homopolymer standard from Beckman Coulter was used as described by Estrada-Mondaca et al. [45]. GUs were then assigned to all observed glycan peaks. Peak areas were integrated utilizing the Beckman Coulter 32 Karat software. Note that in CE, separation is based on the differences in the migration velocities of glycans; therefore slower glycans take more time to pass through the detector window than faster glycans. Consequently, the area of each peak not only depends on analyte concentration but also on its migration velocity. To account for this phenomenon, the CPA (corrected peak area) for each glycan was calculated by multiplying the peak area by its own migration velocity. The relative percentage of CPA for each glycan was calculated by dividing its CPA by the sum of the CPA from all glycans.

The relative glycan content/mol of mAb (glycan site occupancy) was determined by interpolating the total CPA from all glycans detected in each electropherogram (excluding the maltose IS) against a standard curve of APTS-derivatized maltose. This could be done as the stoichiometry of glycan labelling is such that only one molecule of fluorophore binds to each molecule of oligosaccharide.

Determination of oligosaccharide structure by exoglycosidase digestion analysis

On the basis of their migration in GU and susceptibility to specific exoglycosidase digestions, glycan structures were proposed for most peaks. The exoglycosidases used were *Clostridium perfringens* sialidase I (12 m-units), bovine testes β -galactosidase (1.2 m-unit), jack-bean (*Canavalia ensiformis*) meal β -N-acetylhexosaminidase (50 m-units), jack-bean meal α -mannosidase (1.2 units), and bovine kidney α -fucosidase (20 m-units), all from ProZyme (San Leandro, CA, U.S.A.). Labelled glycans corresponding to 6 μ g of purified antibody were digested with each enzyme for 18 h at 37°C and subjected to successive rounds of CE analysis. Our previous experience with digestions of oligosaccharide mixtures and standards has shown that these conditions ensure nearly 100% digestion.

Determination of exoglycosidase activities in cell culture supernatants

Extracellular exoglycosidase activity determinations were performed on cell culture supernatants by incubating substrates (1.1 mM) with samples for 1 h at 37°C in a 100 mM

sodium acetate (pH 6) reaction buffer [46]. The following substrates (all from Sigma) were used: for β -galactosidase, 4-methylumbelliferyl β -D-galactoside; for β -N-acetylhexosaminidase, 4-methylumbelliferyl β -D-N-acetylglucosaminide; and for α -mannosidase, 4-methylumbelliferyl α -D-mannopyranoside. Supernatants without substrate were used as negative controls. Fluorescent digestion products were measured in a PerkinElmer spectrofluorimeter at a $\lambda_{\text{excitation}}$ of 363 nm and a $\lambda_{\text{emission}}$ of 450 nm with 5 nm slit widths in both light paths. Enzymatic activity was calculated by interpolation using a 4-MU (4-methylumbelliferyl) standard curve in the range of 3–270 nM. Enzyme activities are reported in units $\cdot \text{ml}^{-1}$, where 1 unit is defined as the amount of enzyme required to catalyse the release of 1 μmol of 4-MU from its corresponding substrate/min at pH 6 and 37°C.

Oligosaccharide nomenclature

Oligosaccharides were named as follows: A2, complex biantennary structure; MAN, high mannose structure; S#, number of sialic acid residues; G#, number of galactose residues followed by either (1, 3) or (1, 6) according to which antennae the monosaccharide is bound; N#, number of GlcNAc residues; M#, number of mannose residues; F, fucosylated.

Determination of kinetic parameters

Apparent specific cell growth rates (μ), specific consumption rates for glucose (q_{Glc}) and glutamine (q_{Gln}), and specific production rates for lactate (q_{Lac}) and mAb (q_{mAb}) were calculated as described previously [24].

Results

Growth, metabolism and mAb production

Culturing hybridomas in CDM resulted in the highest viable and total cell concentrations (2.9×10^6 and 3.7×10^6 cell $\cdot \text{ml}^{-1}$ respectively), in comparison with either SFM or DMEM/FBS (Figures 1A and 1B). Viability was similar for the three cell culture media used (Figure 1C). Cultures in CDM and DMEM/FBS showed the same maximum specific growth rate of 0.040 h^{-1} , whereas in SFM this parameter reached 0.054 h^{-1} (Table 1). The three culture media had different concentrations of glucose and glutamine, as seen from the values at inoculation (Figures 2A and 2C and Table 1). Yet differences in stoichiometric and kinetic parameters between the three media could not be correlated, in general, to the different initial concentrations of such nutrients. Interestingly, the highest lactate accumulation (Figure 2B), lactate yields (per glucose, and per cell), and lactate production rate were observed for DMEM/FBS medium (Table 1). Maximum mAb concentrations at the end of the cultures were not significantly different between SFM and CDM cultures (Figure 2D and Table 1). However,

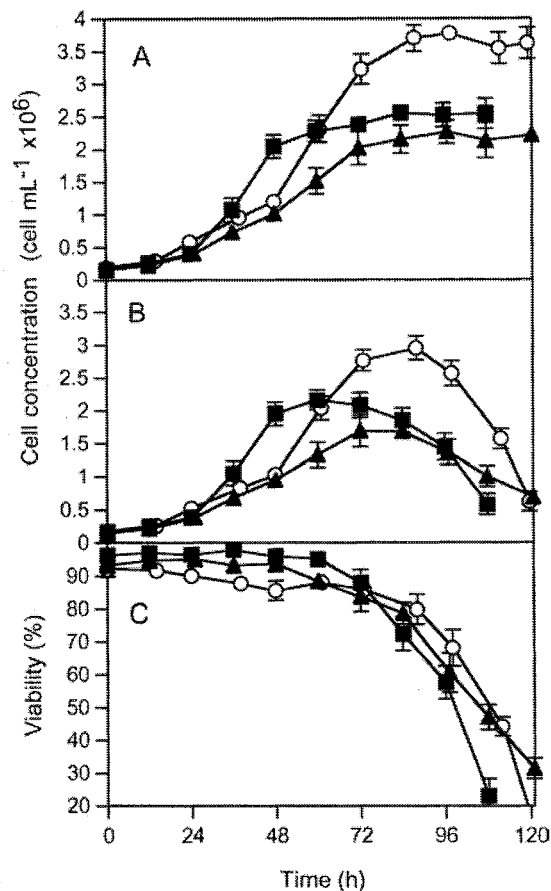


Figure 1 Cell growth and viability in SFM (■), DMEM/FBS (▲) and CDM (○) culture

(A) Total cell concentration. (B) Viable cell concentration. (C) Viability. Mean values and S.D. values for three experiments are shown. In some cases, error bars are smaller than the symbols.

mAb concentration in DMEM/FBS was approx. 25% lower than in SFM and CDM. Nonetheless, the specific mAb production rate under exponential growth was the same for all media tested (Table 1), although the cell yield of mAb was lower in SFM. In general, SFM and CDM media supported better growth, resulting in higher yields of cells (number of cells/pmol of glucose or glutamine) (Table 1). During adaptation of hybridomas to growth in SFM and CDM media, cells completely lost the ability to attach to the surface of the culture flasks, as occurred when cells were grown in DMEM/FBS (results not shown).

Determination of exoglycosidase activity in culture supernatants

Extracellular β -galactosidase, β -N-acetylhexosaminidase and α -mannosidase activities were determined in cell culture supernatants. No interference of protein concentration, up to $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ of albumin, was found on exoglycosidase assays. Therefore FBS should not interfere with exoglycosidase

Table 1 Maximum values and metabolic coefficients from exponential growth phase of cultures in the three cell culture media tested

Y, yield; q, consumption- or production-specific rates of: Glc, glucose; Lac, lactate; Gln, glutamine. Numbers in parentheses indicate S.D. values for triplicate experiments.

Coefficient (units)	Value			
	Medium ...	SFM	DMEM/FBS	CDM
$10^{-6} \times X_{t, \max}$ (cell · ml ⁻¹)		2.55 (0.13)	2.26 (0.18)	3.77 (0.10)
$10^{-6} \times X_{v, \max}$ (cell · ml ⁻¹)		2.16 (0.15)	1.69 (0.24)	2.95 (0.18)
mAb _{max} (mg · l ⁻¹)		87.98 (5.41)	64.64 (4.88)	83.61 (6.04)
Glc _{init} (mM) ^a		19.78 (0.68)	21.96 (0.12)	17.24 (0.41)
Lac _{max} (mM)		28.41 (1.33)	43.48 (0.72)	26.96 (0.42)
Gln _{max} (mM) ^a		5.39 (0.02)	3.88 (0.03)	3.29 (0.04)
μ (h ⁻¹)		0.054 (0.003)	0.042 (0.002)	0.040 (0.002)
Y _{Lac/Glc} (mol · mol ⁻¹)		1.44 (0.07)	1.89 (0.003)	1.59 (0.05)
Y _{cell/Glc} (cell · pmol ⁻¹)		0.18 (0.02)	0.07 (0.01)	0.17 (0.03)
Y _{cell/Gln} (cell · pmol ⁻¹)		0.51 (0.03)	0.28 (0.01)	0.35 (0.04)
Y _{Lac/cell} (pmol · cell ⁻¹)		9.30 (1.25)	22.53 (1.07)	9.97 (0.87)
Y _{mAb/cell} (pg · cell ⁻¹)		18.07 (1.70)	25.90 (1.65)	24.2 (3.24)
q _{Glc} (pmol · h ⁻¹ · cell ⁻¹)		0.30 (0.02)	0.58 (0.07)	0.24 (0.02)
q _{Gln} (pmol · h ⁻¹ · cell ⁻¹)		0.11 (0.002)	0.15 (0.010)	0.11 (0.008)
q _{Lac} (pmol · h ⁻¹ · cell ⁻¹)		0.50 (0.05)	0.95 (0.08)	0.40 (0.02)
q _{mAb} (pg · h ⁻¹ · cell ⁻¹)		0.97 (0.061)	1.09 (0.112)	0.97 (0.078)

^ainit, Initial.

activity determinations. The initial exoglycosidase activities in DMEM/FBS derived from serum (see data in Figure 3 at time zero). As can be seen in Figure 3(A), the highest β -galactosidase activity and production rate were observed in SFM cultures (137×10^{-6} units · ml⁻¹ and 1.27×10^{-6} units · ml⁻¹ · h⁻¹ respectively). Final β -galactosidase activity was three to four times higher in SFM cultures compared with CDM and DMEM/FBS cultures, which reached similar values (36×10^{-6} and 48×10^{-6} units · ml⁻¹ respectively). The initial activity of β -N-acetylhexosaminidase in DMEM/FBS cultures was substantially higher (843×10^{-6} units · ml⁻¹) than that in SFM and CDM cultures, where it was negligible (Figure 3B). Yet, the overall β -N-acetylhexosaminidase production rate was lower in DMEM/FBS (2.4×10^{-6} units · ml⁻¹ · h⁻¹) compared with that in SFM and CDM cultures (2.9×10^{-6} and 4.3×10^{-6} units · ml⁻¹ · h⁻¹ respectively). In the case of α -mannosidase determinations, DMEM/FBS cultures showed the highest activity at the end of the cultures (145×10^{-6} units · ml⁻¹), with more than 2-fold higher activity than that seen in CDM and SFM (Figure 3C). Again, similarly to the activities of β -galactosidase and β -N-acetylhexosaminidase, a high initial α -mannosidase activity was present in DMEM/FBS cultures (27×10^{-6} units · ml⁻¹), whereas it was negligible in the other two culture media. To corroborate exoglycosidase activity, N-glycans, released from a purified BCF2 IgG culture supernatant, were incubated for 21 h at 37 °C in supernatants from cultures of the three media tested. Structures corresponding to degradation products (smaller than 5 GU) increased to 25.5, 34.8 and 50.8% in SFM, CDM and DMEM/FBS respectively compared with

3.9% present at the beginning of the incubation. In contrast, structures corresponding to complex glycans (larger than 5 GU) decreased to 74.5, 65.2 and 49.2% in SFM, CDM and DMEM/FBS respectively compared with 96.1% before incubation.

Glycosylation analysis

Samples taken at the end of duplicate cultures were individually analysed by CE. Representative electropherograms of N-glycan structures are shown in Figure 4. Figure 4(A) shows the 26 peaks corresponding to oligosaccharides associated with the mAb produced on DMEM/FBS medium. The glycosylation profile of bovine IgG, present in FBS, was determined after following the same purification procedure of the murine mAb (results not shown). Such an analysis revealed that only 4.7% of the A2G2F peak corresponded to bovine glycans, whereas for all other peaks the contribution of bovine glycans was between 0.1 and 2.0%. Accordingly, possible contamination by bovine IgG did not affect the conclusions of the present study. Some structures were absent from SFM and CDM cultures, which presented 22 and 24 peaks respectively (Figures 4B and 4C). Detailed structures were proposed for the most prominent peaks based on migration in GU and susceptibility to digestion with specific exoglycosidases (see Figure 5 and Table 2) as described in the Materials and methods section. The proposed structures for 13 of the most abundant glycans associated with the produced mAb are shown in Figure 6. Main peaks (peaks 14, 18, 19 and 22) corresponded to

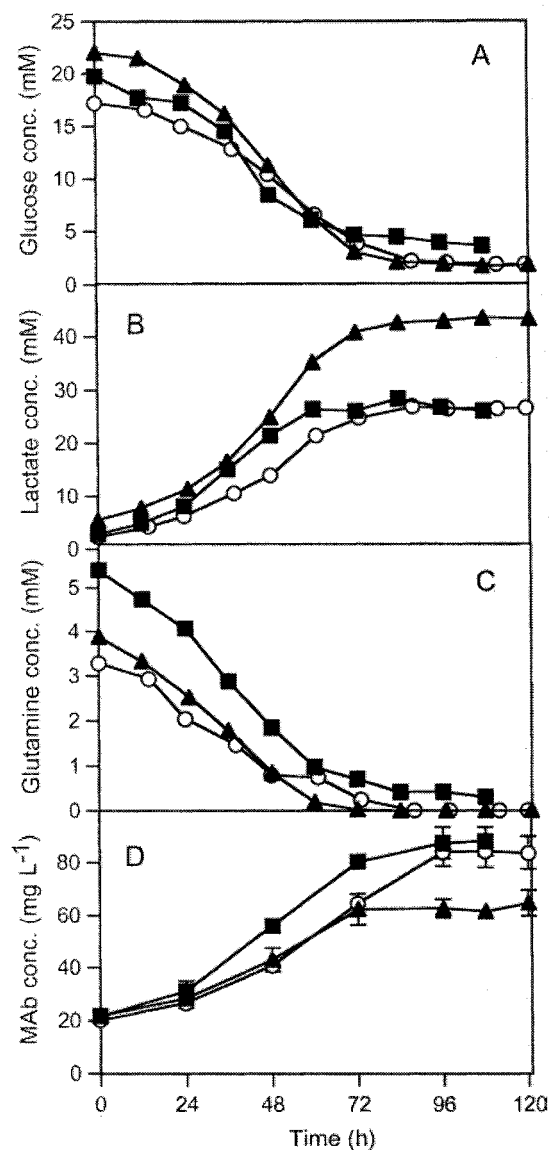


Figure 2 Metabolite and mAb production or consumption kinetics in SFM (■), DMEM/FBS (▲) and CDM (○)

(A) Glucose concentration. (B) Lactate concentration. (C) Glutamine concentration. (D) mAb concentration. Mean values and S.D. values for three experiments are shown. In the majority of cases, error bars are smaller than the symbols.

the complex glycans G0, G1(1,6), G1(1,3) and G2, characteristically found in IgG. All four main structures were also fucosylated. High mannose structures MAN5, MAN7, MAN8 and MAN9 (peaks 11, 17, 20 and 23 respectively) were also present. Relative abundances of paucimannose, high-mannose and complex glycans are shown in Figure 7. In the three media, nearly 90% of all glycans corresponded to complex structures (comprising sialylated, G0, G1, G2 and some unidentified complex glycans). Furthermore, less than

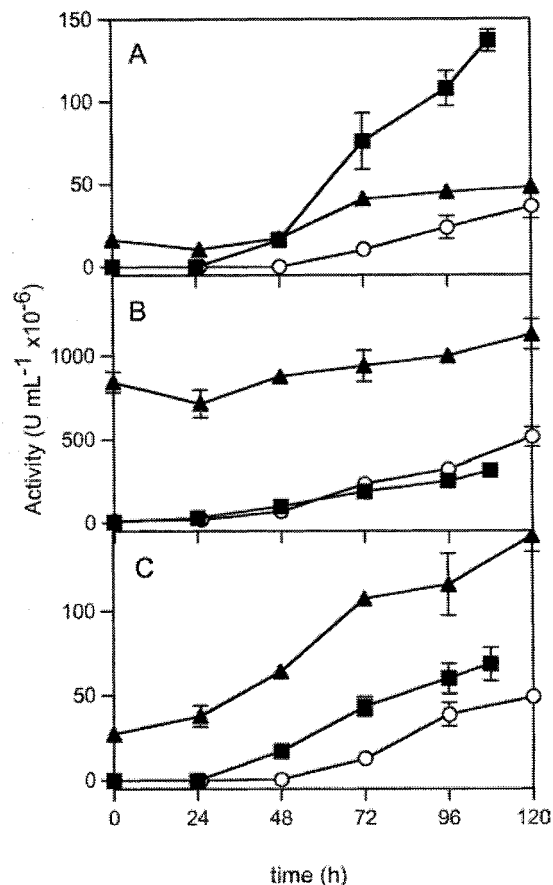


Figure 3 Exoglycosidase activities in SFM (■), DMEM/FBS (▲) and CDM (○) cell culture supernatants

(A) β -Galactosidase activity; (B) β -N-acetylhexosaminidase activity; (C) α -mannosidase activity. Mean values and S.D. values for three experiments are shown. In some cases, error bars are smaller than the symbols.

10% corresponded to high mannose glycans, and less than 2% were paucimannosidic (M3N2F) structures (Figure 7).

Analysing the relative content of complex glycans, G0 and G1 structures were the most abundant (Figure 8). Furthermore, the proportion of G0 and G1 glycans was almost the same in CDM and DMEM/FBS. In these two media, complex glycans without terminal galactose (G0) represented 28 and 32% of the total glycans respectively and 42 and 46% corresponded to galactosylated structures (G1 plus G2) respectively. In contrast, a higher proportion of G0 structures, accounting for approx. 58% of all glycans, was found at the expense of G1 and G2 structures in the mAb produced in SFM (Figure 8). With respect to G2 structures, DMEM/FBS had the highest percentage ($14 \pm 1.1\%$), followed by CDM ($9.8 \pm 0.4\%$) and SFM ($3.2 \pm 0.2\%$) (Figure 8). Sialylated glycans represented the lowest percentage of complex glycans, being $11.3 \pm 3.8\%$, $3.8 \pm 0.4\%$ and $3.2 \pm 0.6\%$ in DMEM/FBS, SFM and CDM respectively.

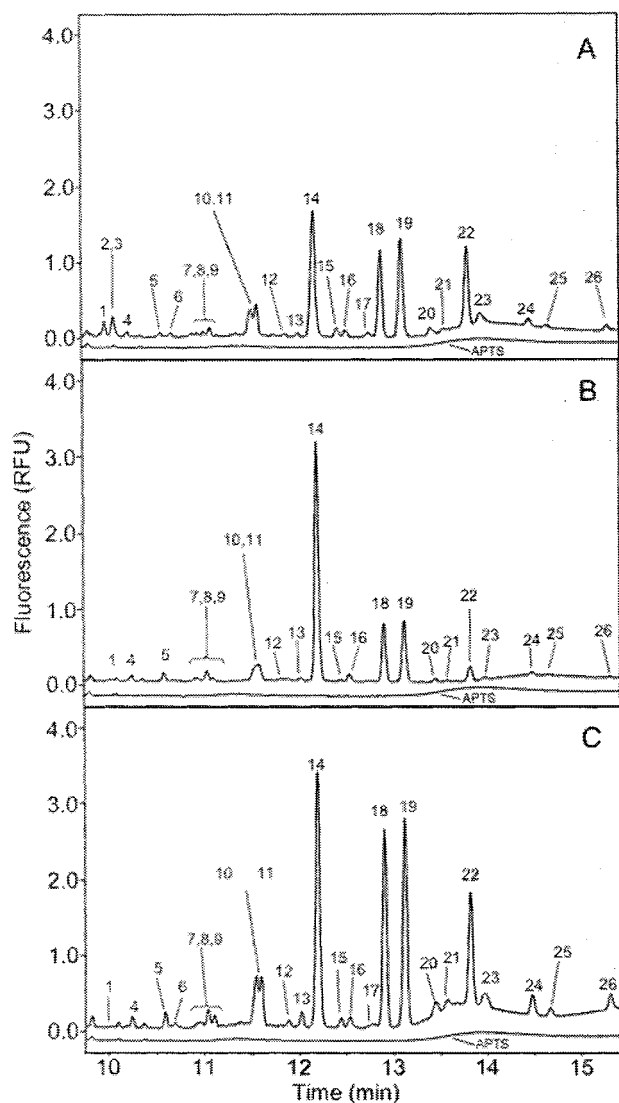


Figure 4 CE electropherograms of N-glycans released from mAb produced in the three different cell culture media

(A) DMEM/FBS medium; (B) SFM medium; (C) CDM medium. A blank is also shown for comparison and is labelled as APTS. Peak numbers correspond to GU shown in Table 2. Glycan structures have been proposed for some peaks and are shown in Figure 6 and Table 2.

The higher percentage observed in DMEM/FBS was mostly due to the presence of three sialylated structures: peaks 2 and 3, detected only in mAb produced in this medium; and the significantly higher proportion of peak 1 in DMEM/FBS in comparison with SFM and CDM. DMEM/FBS yielded the lowest percentage of fucosylated structures ($69.3 \pm 3.6\%$, with respect to total glycan content), whereas higher contents were obtained in CDM and SFM ($77.9 \pm 2.2\%$ and $87.5 \pm 0.1\%$ respectively) (Table 2).

With respect to glycan site occupancy, approx. 80% of the potential mAb glycosylation sites were occupied,

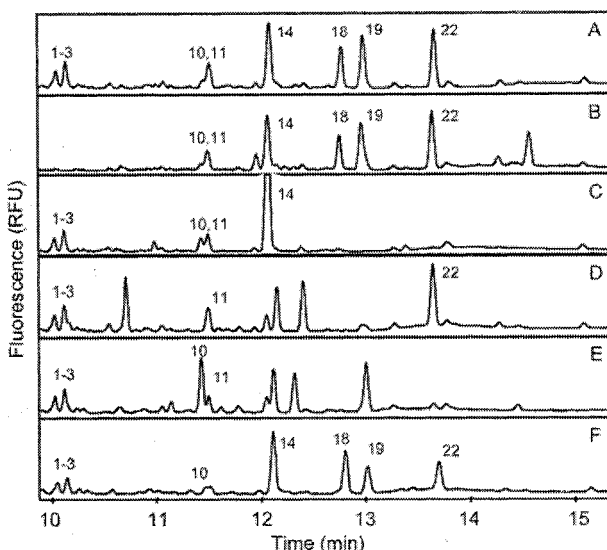


Figure 5 CE electropherograms of exoglycosidase digestions of glycans from an mAb produced in DMEM/FBS

(A) Sample without digestion. (B–F) Samples digested with sialidase (B), β -galactosidase (C), hexosaminidase (D), fucosidase (E) and mannosidase (F). Peak numbers correspond to proposed structures described in Table 2 and Figure 6.

regardless of the culture media used (Figure 9). It should be noted that the mAb produced in the present study lacks potential glycosylation sites within the Fab region [47]; thus all glycans analysed were on the Fc region.

Discussion

Similarly to previous reports [8–11], the cell line used in the present study reached higher cell and mAb concentrations when cultured in SFM and CDM, compared with DMEM/FBS (Table 1). Furthermore, the highest cell yields on glucose and glutamine and the lowest lactate yields (mol of lactate produced by mol of glucose consumed), and glucose were obtained in CDM and SFM (Table 1). In contrast, the highest lactate accumulation, lactate yields (mol of lactate produced by mol of glucose consumed), and per cell, and lactate-specific production rate were obtained in DMEM/FBS, which reflects a detrimental high aerobic glycolytic rate under this medium. Taken independently, such results would underscore the advantage of using improved serum-free media, either chemically defined or not, over traditional cell culture media supplemented with FBS [3–6]. Nonetheless, as shown here, culture media can also affect the glycosylation pattern, and thus the quality, of the mAb produced. Accordingly, mAb productivity should not be the only criteria for selecting a culture medium, especially when producing a glycoprotein intended for therapeutic use.

In the present study, CE was used to determine the glycosylation profile of an mAb produced in three different

Table 2 Peak identification and quantification on the glycosylation profile analysis in mAb produced in the three different cell culture media tested

s, S.D. of six samples. Values in parentheses are differences from the mean between two samples. Mal, maltose; Sial, sialidase; Gal, β -galactosidase; Hex, hexosaminidase; Man, α -mannosidase; Fuc, fucosidase. '+', Digested; '-', undigested. In addition to the exoglycosidase digestion pattern, some structures were proposed based on: ^aGlyco Inc. catalogue at same GUs under the same CE run conditions; ^bMa and Nashabeh [20]; ^cproduct of digestion of A2G0F with fucosidase; ^dproduct of digestion of A2G2F, A2G1(1,3)F and A2G1(1,6)F with β -galactosidase; ^eproduct of digestion of A2G0F with hexosaminidase; ^fproduct of digestion of A2G1(1,3)F with fucosidase.

Peak no.	GU	s	Relative abundance (%)			Exoglycosidase digestion					Structure	
			SFM	DMEM/FBS	CDM	Sial	Gal	Hex	Man	Fuc		
Mal	1.99	0.01										
1	4.59	0.03	0.3 (0)	3.5 (1.3)	0.4 (0.3)	+	-	-	-	-	-	A2G2S2 ^a
2	4.68	0.01	0 (0)	4.8 (1.7)	0 (0)	+	-	-	-	-	-	Sialylated
3	4.72	0.00	0 (0)	1.0 (0.5)	0 (0)	+	-	-	-	-	-	Sialylated
4	4.87	0.01	1.0 (0.2)	0.7 (0.1)	0.9 (0.1)	+	-	-	-	-	-	Sialylated
5	5.32	0.02	1.6 (0)	0.6 (0.1)	1.5 (0.1)	+	-	-	-	-	+	Sialylated
6	5.46	0.01	0 (0)	0.6 (0.1)	0.6 (0.1)	-	-	-	-	+	+	M3N2F ^e
7	5.77	0.01	1.0 (0.1)	0.7 (0.2)	0.4 (0.1)	+	+	-	-	-	-	Sialylated
8	5.93	0.02	2.1 (0)	0.6 (0.1)	1.4 (0.1)	-	-	+	-	-	+	Complex
9	6.02	0.01	0.5 (0)	1.3 (0)	1.1 (0.2)	-	-	-	+	-	-	Paucimannose
10	6.65	0.03	3.4 (0)	4.6 (0.5)	5.2 (0.3)	-	-	+	-	-	-	A2G0 ^c
11	6.72	0.01	3.9 (0.2)	4.9 (0.1)	5.4 (1.2)	-	-	-	-	+	-	MAN5 ^a
12	7.15	0.02	0.3 (0)	0.3 (0.1)	0.6 (0.1)	-	+	-	-	-	-	Galactosylated
13	7.36	0.02	0.4 (0)	0.7 (0.3)	1.3 (0)	-	+	-	-	-	+	Galactosylated
14	7.62	0.02	53.3 (0.8)	22.6 (2.5)	25.7 (0.1)	-	-	-	+	-	+	A2G0F ^{bd}
15	7.99	0.02	0.2 (0)	0.9 (0.3)	0.7 (0)	-	+	+	-	-	-	A2G1(1,3) ^f
16	8.13	0.02	1.5 (0)	0.9 (0)	0.8 (0)	-	-	+	-	-	+	A2G0FB ^a
17	8.49	0.02	0 (0)	0.5 (0)	0.2 (0.1)	-	-	-	-	+	-	MAN7 ^a
18	8.69	0.02	11.9 (0.3)	12.0 (1.5)	16.7 (1.1)	-	+	+	-	-	+	A2G1(1,6) ^{Pb}
19	9.03	0.02	13.0 (0.3)	15.4 (1.2)	18.7 (0.7)	-	+	+	-	-	+	A2G1(1,3) ^{Pb}
20	9.53	0.02	0.5 (0.1)	1.1 (0.1)	1.3 (0.1)	-	-	-	+	-	-	MAN8 ^a
21	9.72	0.02	0.2 (0)	0.3 (0)	0.6 (0.1)	-	-	+	-	-	+	Complex
22	10.11	0.02	3.2 (0.2)	14.0 (1.1)	9.8 (0.4)	-	+	-	-	-	+	A2G2F ^{bd}
23	10.33	0.02	0.4 (0.1)	2.4 (0.2)	1.6 (0.2)	-	-	-	+	-	-	MAN9 ^a
24	11.12	0.03	0.5 (0)	1.1 (0.1)	1.7 (0.1)	-	+	-	-	-	-	Galactosylated
25	11.41	0.02	0.2 (0)	0.5 (0)	0.7 (0)	-	+	-	-	-	+	Galactosylated
26	12.38	0.02	0.2 (0)	1.0 (0.3)	1.3 (0)	-	-	-	-	-	+	?

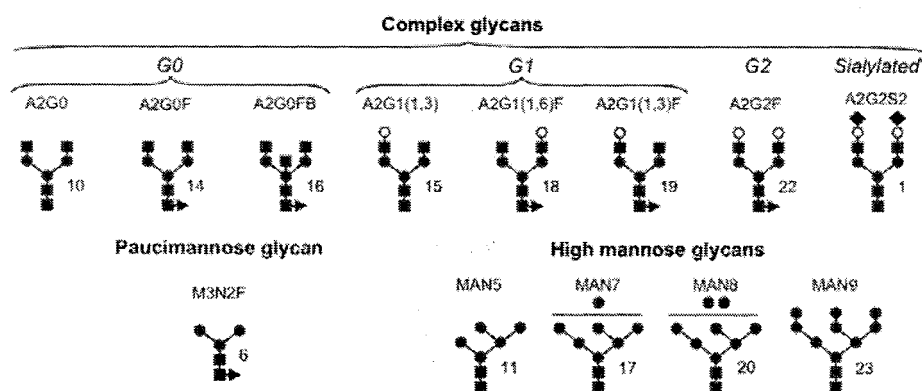


Figure 6 Oligosaccharide structures and their corresponding peak number

(■) GlcNAc; (●) mannose; (○) galactose; (◆) sialic acid; and (▶) fucose. For structures 17 and 20, the antennae to which terminal mannoses were bound were not determined.

culture media. CE was selected as it shows important advantages over other commonly used methods such as HPLC or FACE (fluorescence anisotropy capillary electrophoresis).

Namely, CE is a powerful analytical tool that can rapidly (in less than 20 min) quantify mAb-associated oligosaccharides at the nanomolar concentration range using only very small

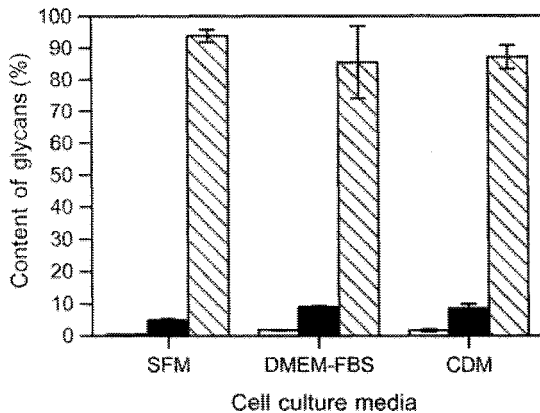


Figure 7 Relative percentage of paucimannose (□), high-mannose (■) and complex-type glycans (▨) in the three cell culture media tested

Mean values and difference between two independent cultures are shown.

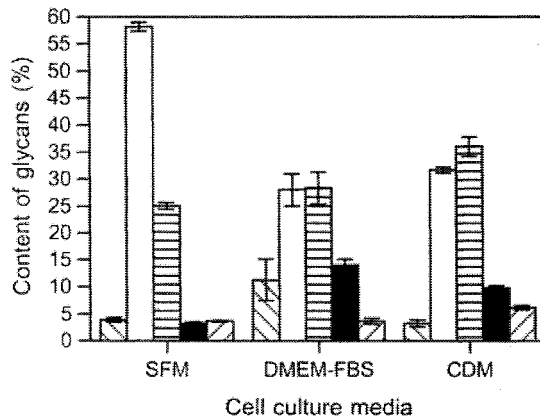


Figure 8 Composition of complex glycans

Percentage of sialylated (▨), G0 (□), G1 (▤), G2 (■) and unidentified (▧) complex glycans in the three cell culture media tested. Mean values and the differences between two independent cultures are shown.

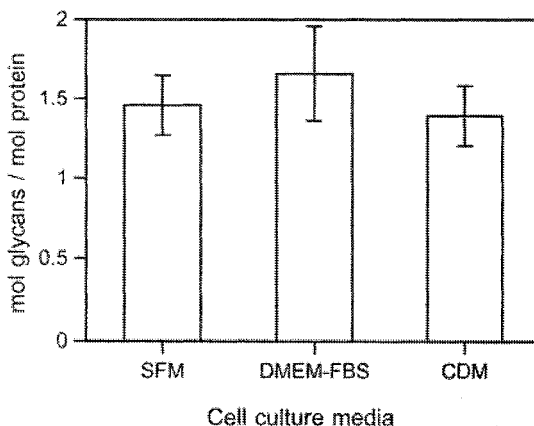


Figure 9 Glycan site occupancy of mAb produced in SFM, DMEM/FBS and CDM cell culture media

Mean values and the differences between two independent cultures are shown.

amounts of sample (in the order of nanolitres). Nonetheless, CE has been scarcely used to date for this purpose [20,22,48], and only relatively few glycan structures have been assigned specific GUs (corresponding to migration times in CE). Accordingly, the structures proposed here contribute in expanding the database of relevant glycan structures resolved by CE in terms of GU, and thus their simple identification by this technique.

In the present study, up to 26 oligosaccharide structures were identified and quantified, including species that accounted for as little as 0.2% of the total glycan content. Glycans absent from CDM and SFM, compared with DMEM/FBS, corresponded to structures with a relative content of less than 5%. It should be noted that many characterization studies report fewer glycan species, as only the main structures are taken into account. For instance, using CE, Mechref et al. [48] reported a total of seven glycans present in the Fc region of a murine mAb, whereas Ma and Nashabe [20] reported four glycan structures associated with a chimaeric mAb produced in CHO cells. In turn, other groups have identified less than five main glycans in different mAbs using HPAEC-PAD (high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection) or HPLC [23,41]. As shown here, a detailed glycan characterization can reveal a higher glycosylation microheterogeneity than that which is usually reported. Quantification of less abundant glycoforms is particularly important for therapeutic mAbs, as it has been recently shown that IgG containing atypical oligosaccharides, such as high-mannose or hybrid structures, have reduced ADCC and reduced CDC (complement-dependent cytotoxicity) [49].

The biological activity of an mAb is closely related to its glycosylation pattern, in particular its degree of sialylation, fucosylation, galactosylation and bisecting GlcNAc [49]. Cultures in both SFM and CDM yielded a lower content and a fewer amount of sialylated structures compared with DMEM/FBS. This was the result of an important decrease in A2G2S2 (peak 1) and the absence of structures corresponding to peaks 2 and 3. In general, the degree of sialylation in IgG has been reported to be below 20% ([24,50]; the present study). This observation has important implications, as it was recently determined by Kaneko et al. [51] that sialylation reduces IgG cytotoxicity. Accordingly, if the effector function of an mAb is sought, then sialylation should be prevented. Contrasting with a desirable decrease in sialylated glycans, an undesirable increase in fucosylation was observed for mAb produced in SFM and CDM (~78 and 88% respectively) compared with DMEM/FBS (~69%). ADCC has been shown to increase by more than 50-fold as antibody fucosylation decreased from 94 to 66% [52] or from 98 to 21% [53], highlighting the important adverse effect that core fucosylation can have on therapeutic mAbs. The degree of galactosylation (G1+G2 structures) was

similar in CDM and DMEM/FBS, at 46 and 42% respectively. Such values are comparable with previous reports for normal human IgG [54]. In contrast, galactosylated structures accounted for only 28% in mAb produced in SFM, and glycoforms without terminal galactose increased to 58%, a value that is similar to that found in IgG of rheumatoid-arthritis patients [19]. The effect of terminal galactose on mAb effector functions is still not exhaustively studied. Some reports have found no obvious effects of antibody degalactosylation on ADCC [52], whereas others have found a significant negative effect [55]. As G0 structures in antibodies correlate with various pathologies [56] and that galactosylated structures predominate in normal individuals, one can infer that higher galactosylation should be desirable.

The glycosylation pattern of an mAb can be affected by the presence of extracellular exoglycosidases, which in turn can depend on the culture media used. However, scarce information exists in this regard. As shown here, FBS contributes with a large amount of exoglycosidases, as β -galactosidase, β -N-acetylhexosaminidase and α -mannosidase activities were initially present only in DMEM/FBS (Figure 3). In particular, β -N-acetylhexosaminidase activity was 10 times higher (843×10^{-6} units \cdot ml $^{-1}$) than the other two enzyme activities measured. Such results highlight the benefits, among others, of eliminating FBS [3–6]. The exoglycosidase activities determined here are in the same order of magnitude as those reported by Gramer and Goochee [46] for hybridomas in a 22-litre air-lift bioreactor. Yet maximum β -galactosidase activity obtained in the present study with CDM and DMEM/FBS was approximately twice that observed by Gramer and Goochee [46], and approx. 6.8 times higher when using SFM. Likewise, β -N-acetylhexosaminidase measured here for SFM, CDM and DMEM/FBS was approx. 2.5 times lower, 1.5 times lower and 1.4 times higher respectively than the values reported by Gramer and Goochee [46]. The high maximum β -N-acetylhexosaminidase activity in DMEM/FBS is a result of the high initial enzyme activity present in the FBS, rather than due to a high accumulation during the culture.

In SFM, where the highest β -galactosidase activity was determined, more than 50% of the glycoforms corresponded to G0 structures, whereas G1 and G2 structures (substrates for β -galactosidase that in turn yields G0) represented only 28%, suggesting a degradation effect by the presence of this enzyme in the medium. Hills et al. [57] observed degalactosylation in an IgG produced in 3-litre batch cultures of NS0 cells, and attributed such a change to proteases and glycosidases released by lysed cells. Likewise, Cabrera et al. [41] have proposed that exoglycosidases were responsible for modifying the galactosylation pattern of an IgG2b mAb, although no enzymatic activity was measured to sustain such a claim. It should be taken into account that glycosylation is a very complex process, where other factors in

addition to hexoglycosidase activity, such as reduced galactosyltransferase activity or limitation of UDP-galactose, could be responsible for the reduced galactosylation observed in SFM. With respect to β -N-acetylhexosaminidase activity, even for DMEM/FBS, which presented the highest enzyme activity, no differences in the glycosylation pattern were found that could indicate a degradation effect. Finally, the absence of MAN6 structure in the three culture media suggests a degradation activity by extracellular α -mannosidase.

Conclusions

It was demonstrated that the selection of culture media for mAb production not only has an impact on hybridoma growth and mAb yield, but it also influences the glycosylation profile of the molecule. CE proved to be a suitable method for glycosylation profiling of mAbs, as a high resolution was achieved using only small sample amounts and a short analysis time. Information generated in the present study describing for the first time the elution times, reported in GUs, of some glycans analysed by CE will be useful for people interested in utilizing such a technique. Reference to GUs allows the use of this information in other laboratories.

SFM and CDM were the media with better performance for hybridoma growth and mAb production, in comparison with serum-containing DMEM. However, each medium yielded a different mAb glycosylation profile. The most important differences were observed in the content of G0, G1 or G2 forms, as cultures in SFM resulted in higher amounts of G0 structures, with a concomitant decrease of G1 and G2 forms, compared with the other two media tested. Such a decrease in galactosylated forms was accompanied by a higher activity of galactosidase activity, suggesting an extracellular cleavage of galactose residues. Compared with DMEM/FBS, mAb produced in SFM and CDM showed a favourable decrease in sialylated structures, although undesirable fucosylated forms increased. Differences in antibody glycosylation profiles, in particular galactosylation, sialylation and fucosylation, can have important repercussions on mAb effector functions, emphasizing the relevance of culture media on product quality. Glycan site occupancy was similar regardless of the culture media utilized. The results presented here provide information for the selection of culture media for producing mAbs, not only regarding optimal productivity of cultures, but also considering the quality of the product.

Acknowledgments

Financial support for this work (grants IX-254404 and IN-220503) was provided by PAPIIT-UNAM (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación

Tecnológica–Universidad Nacional Autónoma de México). J.A.S. was supported (grant I44901) by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) and appreciates helpful discussions with Dr Alejandro Alagón [Instituto de Biotecnología, UNAM, Morelos, Mexico], Dr Fernando R. Esquivel (Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico) and Dr Virginia Walbot (Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, CA, U.S.A.). Technical support by Mr R. Ciria and Mr J. M. Hurtado is acknowledged.

References

- Walsh, G. (2005) *Trends Biotechnol.* **23**, 553–558
- Reichert, J. and Pavlou, A. (2004) *Nat. Rev.* **3**, 383–384
- Froud, S. (1999) *Dev. Biol. Stand.* **99**, 157–166
- Merten, O. (1999) *Dev. Biol. Stand.* **99**, 167–180
- Jayme, D. and Smith, S. (2000) *Cytotechnology* **33**, 27–36
- Even, M., Sandusky, Ch. and Barnard, N. (2006) *Trends Biotechnol.* **24**, 105–108
- Csirke, B., Godwin, G. and Gorfien, S. (1999) *Focus* **21**, 33–34
- Gorfien, S., Godwin, G., Samrock, R. and Tilking, M. (1999) *Focus* **21**, 30–32
- Gorfien, S., Paul, B., Walowitz, J., Keem, R., Biddle, W. and Jayme, D. (2000) *Biotechnol. Prog.* **16**, 682–687
- Voigt, A. and Zintl, F. (1999) *Biotechnol. J.* **68**, 213–226
- Valdés, R., Ibarra, N., González, M., Alvarez, T., García, J., Llambias, R. and Pérez, A. (2001) *Cytotechnology* **35**, 145–154
- Lund, J., Takahashi, N., Nakagawa, H., Goodall, M., Bentley, T., Hindley, S., Tyler, R. and Jefferis, R. (1993) *Mol. Immunol.* **30**, 741–748
- Marino, M., Corti, A., Ippolito, A., Cassani, G. and Fassina, G. (1997) *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 17–25
- Hills, A., Patel, A., Boyd, P. and James, D. (1999) in *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products* (Bernard, A., Griffiths, B., Noé, W. and Wurm, F., eds.), pp. 255–257, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Birch, J. (2000) in *Encyclopedia of Cell Technology* (Spier, R., ed.), pp. 411–423, John Wiley and Sons, New York
- Sutton, B. and Phillips, D. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 130–132
- Clark, M. (1997) *Chem. Immunol.* **65**, 88–110
- Takahashi, N. and Tomiya, N. (1992) in *Handbook of Endoglycosidases and Glycoamidases* (Takahashi, N. and Miramatsu, T., eds.), pp. 199–332, CRC Press, Boca Raton, FL
- Guile, G., Rudd, P., Wing, D. and Dwek, R. (1997) *BioMethods* **9**, 199–234
- Ma, S. and Nashabeh, W. (1999) *Anal. Chem.* **71**, 5185–5192
- Masuda, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Takahashi, N., Shimada, I. and Arata, Y. (2000) *FEBS Lett.* **473**, 349–357
- Raju, T., Briggs, J., Borge, S. and Jones, A. (2000) *Glycobiology* **10**, 477–486
- Saba, J., Kunkel, J., Jan, D., Ens, W., Standing, K., Butler, M., Jamieson, J. and Perrault, H. (2002) *Anal. Biochem.* **305**, 16–31
- Serrato, J. A., Palomares, L. A., Meneses-Acosta, A. and Ramírez, O. T. (2004) *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 176–188
- Jenkins, N., Parekh, R. and James, D. (1996) *Nat. Biotechnol.* **14**, 975–981
- Jefferis, R. and Lund, J. (1997) *Chem. Immunol.* **65**, 111–128
- Jefferis, R., Lund, J. and Pound, J. (1998) *Immunol. Rev.* **163**, 59–76
- Ghirlando, R., Lund, J., Goodall, M. and Jefferis, R. (1999) *Immunol. Lett.* **68**, 47–52
- Lund, J., Takahashi, N., Popplewell, A., Goodall, M., Pound, J., Tyler, R., King, D. and Jefferis, R. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 7246–7256
- Mimura, Y., Church, S., Ghirlando, R., Ashton, P., Dong, S., Goodall, M., Lund, J. and Jefferis, R. (2000) *Mol. Immunol.* **37**, 697–706
- Davies, J., Jiang, L., Pan, L., LaBarre, M., Anderson, D. and Reff, M. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 288–294
- Jassal, R., Jenking, N., Charlwood, J., Camilleri, P., Jefferis, R. and Lund, J. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 243–249
- Shields, R., Namenuk, A., Hong, K., Meng, G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 6591–6604
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R. and Sonderrmann, P. (2003) *J. Mol. Biol.* **325**, 979–989
- Yamane-Ohnuki, N., Kinoshita, S., Inoue-Urakubo, M., Kusunoki, M., Iida, S., Nakano, R., Wakitani, M., Niwa, R., Sakurada, M., Uchida, K. et al. (2004) *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 614–622
- Goochee, C. and Monica, T. (1990) *Bio/Technology* **8**, 421–427
- Goochee, C., Gramer, M., Andersen, D., Bahr, J. and Rasmussen, J. (1991) *Bio/Technology* **9**, 1348–1355
- Andersen, D. and Goochee, C. (1994) *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 546–549
- Patel, T., Parekh, R., Moellering, B. and Prior, P. (1992) *Biochem. J.* **285**, 839–845
- Lifely, M., Hale, C., Boyce, S., Keen, M. and Phillips, J. (1995) *Glycobiology* **5**, 813–822
- Cabrera, G., Cremata, J., Valdés, R., García, R., González, Y., Montesino, R., Gómez, H. and González, M. (2005) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **41**, 67–76
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martín, B., Gurrola-Briones, G., Herion, P. and Possani, L. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 281–292
- Higareda, A. E., Possani, L. D. and Ramírez, O. T. (1994) *Cytotechnology* **15**, 73–86
- Schuler, G. and Reinacher, M. (1991) *J. Chromatogr.* **587**, 61–70

- 45 Estrada-Mondaca, S., Delgado-Bustos, L. A. and Ramírez, O. T. (2005) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **42**, 25–34
- 46 Gramer, M. and Goochee, C. (1994) *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 423–428
- 47 Selisko, B., Licea, A., Becerril, B., Zamudio, F., Possani, L. and Horjales, E. (1999) *Proteins* **37**, 130–143
- 48 Mechref, Y., Muzikar, J. and Novotny, M. (2005) *Electrophoresis* **26**, 2034–2064
- 49 Kanda, Y., Yamada, T., Mori, K., Okazaki, A., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., Kuni-Kamochi, R., Nakano, R., Yano, K., Kakita, S. et al. (2006) *Glycobiology* **17**, 104–118
- 50 Jefferis, R. (2005) *Biotechnol. Prog.* **21**, 11–16
- 51 Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. (2006) *Science* **313**, 670–673
- 52 Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M. et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3466–3473
- 53 Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. A. and Presta, L. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26733–26740
- 54 Routier, F. H., Hounsell, E. F., Rudd, P. M., Takahashi, N., Bond, A., Hay, F. C., Alavi, A., Axford, J. S. and Jefferis, R. (1998) *J. Immunol. Methods* **213**, 113–130
- 55 Hodoniczky, J., Zheng, Y. Z. and James, D. C. (2005) *Biotechnol. Prog.* **21**, 1644–1652
- 56 Parek, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T. and Matsuta, K. (1985) *Nature* **316**, 452–457
- 57 Hills, A., Patel, A., Boyd, P. and James, D. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 239–251

Received 1 November 2006/19 December 2006; accepted 25 January 2007
Published as Immediate Publication 25 January 2007, doi:10.1042/BA20060216
