



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EVALUACIÓN DE PROCESOS DE PRODUCCIÓN CONTINUOS DE UN
ANTICUERPO MONOCLONAL**

TESIS

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

**PRESENTA:
Juan Carlos Rivera Castro**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Laura A. Palomares
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura A. Palomares. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría 448437 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT. Investigación realizada gracias al programa UNAM PAPIIT IT 200315 y al proyecto SEP-CONACyT 255445.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Palomares por haber aceptado ser mi asesora y haber contribuido en mi formación profesional. Por su apoyo, motivación, consejos y enseñanzas a lo largo de la realización de este proyecto.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por su orientación, consejos y sugerencias a lo largo de la realización de este proyecto.

A la Dra. Palomarez y al Dr. Ramírez por haberme dado la oportunidad de ingresar en su grupo.

Al M.C. Alfonso Gómez por haberme instruido y apoyado en la realización de cultivos.

A la M.C. Vanessa Hernández por haberme instruido y apoyado en el análisis de anticuerpos.

A la M.C. Martha Contreras y a la M.C. Ruth Pastor por su instrucción y apoyo en el laboratorio y cuartos de cultivo.

Al Laboratorio Nacional para la Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos (LAMMB) en especial al Dr. Ricardo Castro por permitirme el acceso a sus instalaciones.

Al Dr. Alfredo Martínez y a la Dra. Adriana Valdez por haber aceptado formar parte de mi comité tutor y por todos sus comentarios, críticas y sugerencias durante la realización del proyecto.

Al Dr. Agustín López, la Dra. Marcela Ayala, el Dr. Gerardo Corzo, el Dr. Mauricio Trujillo y el Dr. José Luís Montiel por haber aceptado ser parte de mi jurado, por sus comentarios y sugerencias.

Al Ing. Oscar Melo (Applikon) por su asesoría y préstamo del sistema Biosep y Futura que fueron esenciales para llevar a cabo este proyecto.

Al Ing. Emmanuel Pichardo por su apoyo en la ejecución de cultivos.

Al Ing. Alberto Porras, al M.C. Miguel Mendoza, al Ing. David Montes y al Dr. Norberto Cruz por haber apoyado en distintas tareas de este proyecto.

A Karin Levy y Larisa Campos por su apoyo administrativo.

A Antonio Bolaños y Gloria Villa por su apoyo en todos los tramites de docencia.

A cada uno de los miembros del grupo Palomares Ramírez y LAMMB por su apoyo y amistad.


JUAN CARLOS RIVERA CASTRO

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del día 07 de mayo del 2018 el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente jurado para Examen de Maestría en Ciencias, con **No.de cuenta 517013739** con la tesis titulada, **"Evaluación de procesos de producción continuos de un anticuerpo monoclonal"** dirigida por la **Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera**.

Presidente	Dr.	Agustín López Munguía Canales
Secretario	Dra.	Marcela Ayala Aceves
Vocal	Dr.	Mauricio Alberto Trujillo Roldán
Vocal	Dr.	Gerardo Corzo Burguete
Vocal	Dr.	José Luis Montiel Hernández

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 07 de mayo de 2018



Dra. Marcela Ayala Aceves
Coordinadora de Docencia

En un plazo máximo de tres semanas, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato

Índice de contenido

	Pág
Índice de contenido	iv
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xii
Índice de ecuaciones	xiv
Abreviaturas y símbolos	xvi
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 ANTECEDENTES	6
2.1 Los anticuerpos monoclonales y la importancia de los perfiles de glicosilación y de variantes de carga	6
2.2 Perfil de N-glicosilación	9
2.3 Variantes de carga	13
2.4 Factores celulares y de proceso que influyen en la producción y perfiles de glicoformas y de variantes de carga del AcM	21
2.4.1 Velocidad de crecimiento	21
2.4.2 Medio de cultivo y nutrientes	23
2.5 Formas de caracterizar el efecto	24
2.6 Perspectivas para el control de la velocidad específica de crecimiento	27
3 JUSTIFICACIÓN	28
4 HIPÓTESIS	28
5 OBJETIVOS	29

5.1	Objetivo general	29
5.2	Objetivos particulares	29
6	MATERIALES Y METODOS	30
6.1	Línea celular y medio de cultivo	30
6.2	Características de los cultivos estudiados	30
6.3	Cultivos tipo lote en matraz Erlenmeyer	31
6.4	Cultivos semicontinuos en matraz Erlenmeyer	31
6.4.1	Recambio de medio de cultivo y toma de muestras	31
6.5	Cultivo continuo en biorreactor en modo de perfusión	32
6.5.1	Recambio de medio de cultivo y toma de muestras	37
6.5.2	Cálculo de la alimentación de volumen de medio de cultivo por célula para obtener velocidades de crecimiento predefinidas en cultivos en perfusión	38
6.5.3	Balance de biomasa	38
6.5.4	Determinación de la tasa de drenado y tasa de perfusión	40
6.5.5	Calculo de la eficiencia de perfusión en proceso	41
6.5.6	Determinación de alfa en proceso (fracción de retención celular)	41
6.5.7	Determinación de la concentración celular a partir de capacitancia del sensor de biomasa	42
6.6	Determinación de parámetros cinéticos	42
6.6.1	Determinación de μ_{max} en cultivo tipo lote	42
6.6.2	Ajuste del modelo de crecimiento en cultivo tipo lote	43
6.6.3	Calculo de la velocidad específica de crecimiento en cultivo semicontinuo	43
6.6.4	Calculo de la velocidad específica de crecimiento en perfusión	44

6.6.5	Calculo del área bajo la curva	44
6.6.6	Cálculo de velocidades de consumo de nutrientes o generación de metabolitos secundarios	45
6.6.7	Cálculo de velocidad de consumo de medio de cultivo en cultivo semicontinuo	45
6.6.8	Cálculo de la concentración celular o de nutrientes después de un recambio en cultivo semicontinuo	46
6.7	Calculo del rendimiento de metabolitos	46
6.8	Determinación del estado estable	46
6.9	Purificación de muestras mediante proteína A	47
6.10	Diafiltración y concentración de muestras	47
6.11	Análisis de nutrientes y metabolitos	48
6.12	Cuantificación de IgG	48
6.13	Electroforesis en gel	49
6.14	Determinación del perfil de variantes de carga	49
6.15	Determinación del perfil de N-glicosilación por HPLC	50
6.16	Viabilidad celular	53
6.17	Determinación de la productividad y rendimiento para cultivo continuo o semicontinuo	53
6.18	Análisis estadístico	54
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
7.1	Determinación del estado estable de los cultivos, para la evaluación del AcM y metabolismo	57
7.1.1	Puntos de muestreo para el análisis de productividad, rendimiento y perfiles de glicosilación y de variantes de carga	62
7.1.2	Tasa de dilución y tiempo de residencia	63
7.1.3	Velocidad específica de crecimiento, viabilidad y concentración celular	63

7.2	Productividad y rendimiento	64
7.3	Metabolismo a diferentes velocidades de crecimiento	65
7.4	Definición de conjuntos de cultivos para la comparación de los parámetros analizados del AcM	70
7.5	Perfil de glicosilación	71
7.6	Variantes de carga	81
8	LIMITANTES DEL PROYECTO	85
9	CONCLUSIONES	86
10	PERSPECTIVAS	87
11	REFERENCIAS	88
12	ANEXOS	94
12.1	Cultivo tipo lote	94
	12.1.1 Cinéticas de crecimiento	94
	12.1.2 Metabolismo	95
12.2	Cultivo semicontinuo	97
	12.2.1 Expansión celular e inicio de cultivo	97
	12.2.2 Cinética de crecimiento	99
	12.2.3 Metabolismo	103
	12.2.4 Consumo de medio de cultivo por célula	107
12.3	Cultivo continuo en biorreactor tipo perfusión	108
	12.3.1 Determinación de la concentración celular durante los cultivos	109
	12.3.2 Cultivo perfusión al 50% de μ_{\max}	112
	12.3.3 Cultivo perfusión al 20% de μ_{\max}	114

12.4	Análisis de los perfiles de glicosilación y de variantes de carga del AcM	116
	12.4.1 Variantes de carga	117
	12.4.2 Perfil de glicosilación	117
12.5	Análisis estadístico	119
12.6	Electroforesis en gel	120

Índice de Figuras

	Pág
Figura 1. Esquema de IgG.	7
Figura 2. Glicosilación de proteínas en retículo endoplásmico y aparato de Golgi.	11
Figura 3. Biosíntesis e interconversión de monosacáridos en células de mamífero.	13
Figura 4. Reacciones involucradas en la generación de variantes de carga encontradas en la fracción principal, separada por cromatografía de intercambio catiónico.	17
Figura 5. Reacciones involucradas en la generación de variantes de carga encontradas en la fracción ácida, separada por cromatografía de intercambio catiónico.	18
Figura 6. Reacciones involucradas en la generación de variantes de carga encontradas en la fracción básica, separada por cromatografía de intercambio catiónico.	19
Figura 7. Estructura primaria de un IgG1 humano típico.	21
Figura 8. Esquema de operación del cultivo semicontinuo.	32
Figura 9. Esquema del sistema de perfusión, drenado y alimentación en el cultivo de perfusión.	35
Figura 10. Sistema de cultivo continuo en modo de perfusión utilizado en este proyecto.	36
Figura 11. Esquema de la alimentación, muestreo y cosecha del cultivo continuo en modo de perfusión.	37
Figura 12. Periodos del estado estable en cultivos en perfusión.	58
Figura 13. Periodos de estado estable en cultivos en matraz.	60
Figura 14. Cromatograma representativo del análisis de glicanos.	73
Figura 15. Distribución relativa de los distintos grupos de glicofomas presentes en el anticuerpo de los cultivos estudiados.	76

Figura 16. Cromatograma representativo obtenido mediante separación cromatográfica por intercambio catiónico del AcM analizado.	81
Figura 17. Distribución relativa de las variantes de carga presentes en el anticuerpo de los cultivos estudiados.	82
Figura A1. Cinéticas de crecimiento de cultivo tipo lote.	94
Figura A2. Cinéticas del metabolismo de cultivo tipo lote.	95
Figura A3. Descripción del modelo de crecimiento en fase exponencial.	97
Figura A4. Esquema del proceso de inicio del cultivo semicontinuo.	98
Figura A5. Cinéticas de crecimiento de cultivo semicontinuo.	100
Figura A6. Análisis de velocidades específicas de crecimiento en cultivos semicontinuos.	101
Figura A7. Cinéticas del metabolismo de cultivos semicontinuos	105
Figura A8. Correlación entre la velocidad específica de crecimiento y el consumo de medio de cultivo.	108
Figura A9. Correlación de la concentración celular y la capacitancia.	110
Figura A10. Cinética de crecimiento durante el cultivo de perfusión al 50% de μ_{max}	112
Figura A11. Cinéticas de las concentraciones de los distintos nutrientes del medio de cultivo de perfusión al 50% de μ_{max} .	113
Figura A12. Cinética de crecimiento durante el cultivo de perfusión al 20% de μ_{max} .	114
Figura A13. Cinéticas de las concentraciones de los distintos nutrientes del medio de cultivo de perfusión al 20% de μ_{max} .	115
Figura A14. SDS-PAGE en condiciones reductoras, para cultivos semicontinuos a un periodo de 15 días.	121
Figura A15. SDS-PAGE en condiciones nativas para cultivos semicontinuos a un periodo de 15 días.	122
Figura A16. SDS-PAGE en condiciones reductoras, para cultivos semicontinuos de 25 y 34 días.	123

Figura A17. SDS-PAGE en condiciones nativas, para cultivos semicontinuos a 25 y 34 días. 124

Figura A18. SDS-PAGE en condiciones reductoras para cultivos de perfusión. 125

Figura A19. SDS-PAGE en condiciones nativas, para cultivos de perfusión. 126

Figura A20. SDS-PAGE en condiciones nativas, utilizando un gel de gradiente, para cultivos de perfusión. 127

Índice de Tablas

	Pág
Tabla 1. Características de los cultivos estudiados.	30
Tabla 2. Condiciones de operación del cultivo de perfusión.	34
Tabla 3. Puntos de muestreo en los diferentes cultivos.	62
Tabla 4. Tasa de dilución y tiempo de residencia en los cultivos.	63
Tabla 5. Viabilidad celular, concentración y velocidad de crecimiento.	64
Tabla 6. Rendimiento y productividad de AcM en los distintos cultivos.	65
Tabla 7. Velocidades de consumo de nutrientes en el estado estable.	66
Tabla 8. Rendimiento de lactato y amonio en el estado estable expresados en relación mol/mol.	66
Tabla 9. Concentraciones de nutrientes en el estado estable.	66
Tabla 10. Puntos de muestreo de los cultivos de perfusión considerados para el análisis estadístico.	70
Tabla 11. Glicoformas que fueron consideradas en el análisis cromatográfico del perfil de glicosilación.	72
Tabla 12. Clasificación de glicanos por grupos.	74
Tabla 13. Abundancia relativa de glicoformas en el estado de equilibrio de los distintos cultivos estudiados.	75
Tabla 14. Efecto de la variación de la velocidad específica de crecimiento sobre las distintas glicoformas.	78
Tabla 15. Perfil de variantes de carga del anticuerpo producido en los distintos cultivos.	82
Tabla 16. Efecto de la variación de la velocidad específica de crecimiento sobre la distribución de variantes de carga.	83
Tabla A1. Velocidades específicas de consumo de nutrientes y de generación de metabolitos en cultivo tipo lote.	96

Tabla A2. Matriz experimental del cultivo semicontinuo.	99
Tabla A3. Distribución de velocidad específica de crecimiento en cultivo semicontinuo.	103
Tabla A4. Concentraciones de nutrientes/metabolitos en medio de cultivo fresco.	103
Tabla A5. Velocidades específicas de consumo de nutrientes y de generación de metabolitos, para cultivos tipo lote y cultivo semicontinuo.	104
Tabla A6. Correlación entre concentraciones celulares determinadas en cámara de Neubauer y el sensor de biomasa Futura.	111
Tabla A7. Estadística descriptiva de la distribución de las variantes de carga.	117
Tabla A8. Perfil de glicosilación del anticuerpo.	117
Tabla A9. Estadística descriptiva de la abundancia relativa de los glicanos paucimanosa, manosa 5 y no identificados.	118
Tabla A10. Estadística descriptiva de la abundancia relativa de los glicanos híbridos, complejos y G0.	118
Tabla A11. Estadística descriptiva de la abundancia relativa de los glicanos G1, G2 y Fucosilados.	118
Tabla A12. Discriminación de glicanos no identificados mediante digestión enzimática.	119
Tabla A13. Dictamen de las pruebas t de Student y F de Fischer del comparativo del perfil de glicosilación, perfil de variantes de carga, productividad y rendimiento del AcM producido a diferentes velocidades de crecimiento.	120

Índice de Ecuaciones

	Pág
Ecuación 1. Calculo de la velocidad específica de perfusión celular.	27
Ecuación 2. Calculo de volumen a recambiar en reactor semicontinuo.	31
Ecuación 3. Calculo de la velocidad de consumo de medio de cultivo por célula para velocidades de crecimiento predefinidas.	38
Ecuación 4. Calculo de la tasa de dilución para concentración celular y velocidad de crecimiento predefinidas.	38
Ecuación 5. Balance de biomasa.	39
Ecuación 6. Correlación de μ con la tasa de dilución y fracción de retención celular, en estado estable.	39
Ecuación 7. Determinación de alfa objetivo (fracción de retención celular).	40
Ecuación 8. Determinación de tasa de perfusión.	40
Ecuación 9. Determinación de tasa de drenado.	40
Ecuación 10. Conversión de tasas de dilución a flujos.	40
Ecuación 11. Determinación de la eficiencia de retención de la perfusión.	41
Ecuación 12. Determinación de alfa en proceso (fracción de retención celular).	41
Ecuación 13. Determinación de la concentración celular a partir de capacitancia del sensor de Biomasa.	42
Ecuación 14. Determinación de μ_{max} en cultivo tipo lote.	42
Ecuación 15. Ajuste del modelo de crecimiento en cultivo tipo lote.	43
Ecuación 16. Calculo de la velocidad específica de crecimiento en cultivo semicontinuo.	43
Ecuación 17. Calculo de la velocidad específica de crecimiento en perfusión.	44
Ecuación 18. Determinación del área bajo la curva.	44

Ecuación 19. Calculo de la velocidad de consumo de nutrientes o generación de metabolitos secundarios en cultivo tipo lote y semicontinuo.	45
Ecuación 20. Calculo de la velocidad de consumo de nutrientes o generación de metabolitos secundarios en cultivo continuo.	45
Ecuación 21. Calculo de velocidad de consumo de medio de cultivo en cultivo semicontinuo.	45
Ecuación 22. Calculo de la concentración celular o de nutrientes después de un recambio en cultivo semicontinuo.	46
Ecuación 23. Determinación del rendimiento de metabolitos.	46
Ecuación 24. Conversión de tiempo de retención en minutos a unidades de glucosa.	52
Ecuación 25. Calculo de concentración celular a partir de conteo en cámara de Neubauer.	53
Ecuación 26. Calculo de la viabilidad celular.	53
Ecuación 27. Calculo del rendimiento en cultivo continuo o semicontinuo.	53
Ecuación 28. Calculo de la productividad en cultivo continuo o semicontinuo.	54
Ecuación 29. Calculo de varianza combinada.	54
Ecuación 30. Calculo de t_0 para prueba t de Student.	55
Ecuación 31. Calculo de F_0 para prueba F de Fisher.	55

Abreviaturas y símbolos

μ	Velocidad específica de crecimiento
μ_{\max}	Velocidad específica de crecimiento máxima
μ_{obj}	Velocidad específica de crecimiento objetivo
2-AB	2-aminobenzamida
A	Anexo
ABC	Área bajo la curva
AcM	Anticuerpo monoclonal
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo
ADCP	Fagocitosis celular dependiente del anticuerpo
Amo	Amonio
ATF	Filtración de flujo tangencial alternante
CCP	Concentración celular promedio
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento
C_e	Concentración de entrada al reactor
Cel	Células
C_f	Concentración final
CHO	Ovario de hámster chino
C_i	Concentración inicial
CMP	Monofosfato de citidina
CV	Coeficiente de variación
D	Diferente (en comparativo de medias o desviación estándar)
D	Tasa de dilución
DE	Desviación estándar
D_p	Tasa de perfusión
D_s	Tasa de drenado
dt	Diferencial del tiempo
dx	Diferencial de células
F	Faraday (medida de capacitancia)
F	flujo
Fab	Fracción de unión al antígeno
Fc	Fracción cristalizable
FcRn	Receptor neonatal
Fuc	Fucosa
FucT	Fucosiltransferasa
G0	N-acetilglucosamina bisectado y agalactosilado
G1	Monogalactosilado

G2	Bigalactosilado
Gal	Galactosa
GalT	Galactosiltransferasa
GDP	Difosfato de guanosa
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GnTI	N-acetilglucosaminiltransferasa I
GnTII	N-acetilglucosaminiltransferasa II
H ₀	Hipótesis nula
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I	Igual (en comparativo de medias o desviación estándar)
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilodalton
Lac	Lactato
Man	Manosa
Man5	Glicano con 5 manosas
ManI	Manosidasa I
ManII	Manosidasa II
MCR	Medio de cultivo recambiado
MES	Ácido 2-morfolino etano sulfónico
n	Numero de replicas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PNGasa F	Peptido-N-glicosidasa F
q _{amo}	Velocidad de producción de lactato
q _{Glc}	Velocidad de consumo de glucosa
q _{Gln}	Velocidad de consumo de glutamina
q _{Glu}	Velocidad de consumo de glutamato
q _{lac}	Velocidad de producción de lactato
q _{medio}	Velocidad de consumo de medio de cultivo
R	Replica
R ²	Coefficiente de correlación
Rpm	Revoluciones por minuto
S ²	Varianza muestral
S ² _p	Varianza combinada
SDS	Dodecilsulfato sódico
SiaT	Sialiltransferasa

TC	Tiempo considerado para el siguiente recambio
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TFF	Filtración de flujo tangencial
UDP	Difosfato de uridina
V	Volumen
V _B	Volumen del biorreactor
V _c	Volumen de medio de cultivo en el reactor
Viab.	Viabilidad
V _r	Volumen de recambio
X _{obj}	Concentración celular objetivo
Y _{Amo/Gln}	Rendimiento de moles de amonio por moles de glutamina
Y _{Lac/Glc}	Rendimiento de moles de lactato por moles de glucosa
α	Fracción de retención celular
σ	Desviación estándar poblacional
σ ²	Varianza poblacional
x	Concentración celular
\bar{x}	Promedio

RESUMEN

Los anticuerpos monoclonales (AcM) han sido utilizados para el tratamiento de diferentes padecimientos por su especificidad, eficacia y prolongada vida media en circulación (An, 2018). Las IgG se caracterizan por contener estructuralmente 2 regiones de importancia funcional, la región Fab, que reconoce el antígeno, y la región Fc, que induce la función efectora. La región Fc contiene una Asparagina 297 conservada, la cual puede ser glicosilada y, por lo tanto, impactar en su función efectora y vida media.

La producción recombinante de AcM en gran escala se ha realizado, principalmente, en células de ovario de hámster chino (CHO). Con este sistema celular, se ha encontrado que diversos factores del bioproceso, como son: el pH, tiempo de residencia, temperatura y concentración de nutrientes, influyen en las modificaciones postraduccionales enzimáticas o químicas del anticuerpo. Estas modificaciones ocasionan heterogeneidad en el perfil de glicosilación y en sus variantes de carga. Dependiendo del sitio de modificación y tipo de modificación será el efecto en la funcionalidad y/o la farmacocinética del anticuerpo (Beyer et al., 2018 y Du et al., 2012).

Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la velocidad específica de crecimiento pueda tener un efecto sobre el perfil de glicosilación, y distribución de las variantes de carga. En caso de existir esta relación, se tendría la posibilidad de producir AcM en condiciones de crecimiento que favorezcan la obtención de perfiles de glicosilación más de acuerdo con la función efectora deseada. O por el otro lado, limitar la presencia de glicofomas que afecten su farmacocinética y con esto se podría incrementar la relación costo beneficio de los sistemas de producción de AcM con funciones terapéuticas. De esa manera, el presente proyecto tuvo como objetivo el evaluar el efecto de la velocidad específica de crecimiento de las células productoras de AcM sobre el perfil de glicosilación y la distribución de variantes de carga. Para alcanzar este objetivo, se desarrollaron estrategias que permitieron controlar la velocidad de crecimiento de una línea celular CHO K1 productora de un IgG1. En primera instancia se estudiaron 2 cultivos semicontinuos en matraces donde se obtuvieron velocidades de crecimiento en el estado pseudo-estable de

10.4 ± 44.8 % μ_{\max} y 58.6 ± 19.4 % μ_{\max} . Posteriormente se estudiaron 2 cultivos utilizando un sistema de perfusión en biorreactor, donde se obtuvieron velocidades de crecimiento de 52.8 ± 5.3 % μ_{\max} y 19.1 ± 2.0 % μ_{\max} . Por la baja variabilidad encontrada y por alcanzar estados estables reales, resultó un mejor sistema de estudio el cultivo en perfusión. Asimismo, se encontró que al incrementar la velocidad específica de crecimiento se redujo la abundancia relativa de glicanos manosa 5 y glicanos híbridos, al tiempo que se incrementó la abundancia relativa de glicanos complejos, G1, G2 y fucosilados. Por otro lado, se encontró que al incrementar la velocidad de crecimiento disminuyó la abundancia relativa de la fracción principal. Con estos resultados se aceptó la hipótesis del proyecto, que propone que la velocidad específica de crecimiento celular influye sobre los perfiles de glicosilación y las variantes de carga de un AcM recombinante.

1 INTRODUCCIÓN

En 1977 Niels K. Jerne, Georges J.F. Köhler y César Milstein desarrollaron la tecnología del híbridoma. Esto fue el punto de partida para la producción de anticuerpos monoespecíficos producidos por una sola clona (monoclonales). Esto permitió la producción de AcM en cantidades suficientes para la investigación o terapia. El primer estudio clínico exitoso de un AcM para evitar el rechazo de órganos sucedió en 1986 (Zhou y Mascelli, 2011). Los AcM más abundantes y relevantes para la biotecnología son las inmunoglobulinas G (IgG). Las cuales han revolucionado la medicina al dirigir su actividad biológica a sitios específicos, pudiendo ser utilizados para el tratamiento de diferentes padecimientos, que incluyen cáncer, desórdenes inflamatorios, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares y neurológicas (Sha et al., 2016 y An, 2018). Las inmunoglobulinas G se caracterizan por contener estructuralmente dos regiones de importancia funcional: una región de reconocimiento del antígeno, que es aquella que reconoce a la molécula o célula blanco para el cual es específico; y una región Fc que realiza la función efectora. Finalmente, esta última región puede activar el sistema inmune ocasionando el reclutamiento de células inmunitarias que pueden fagocitar o lisar al antígeno. Por otro lado, los anticuerpos libres son reconocidos en esta región por el receptor neonatal, el cual incrementa su vida media (Janeway et al., 2012). Los IgG1 en su región Fc contienen una asparagina 297 conservada, la cual es glicosilada en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Esta modificación postraduccional puede modificar la función efectora y vida media del anticuerpo en circulación. Se ha reportado que la ausencia de fucosa incrementa la acción efectora lítica por células NK, conocida como citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) (Mimura et al., 2018). Por otro lado, la presencia de galactosas incrementa la ADCC y favorece la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Houde et al., 2010, Hodoniczky et al., 2005 y Chung et al., 2014, Liu, 2015). Finalmente, la presencia de glicanos altos en manosa reduce la vida media del anticuerpo (Slade et al., 2016). En el caso de que el anticuerpo no esté glicosilado ocasiona una reducción considerable de su función efectora (Jefferis, 2009). Debido al creciente uso y

amplia aplicación en los procedimientos terapéuticos, se ha requerido la producción en gran escala de estas biomoléculas, para lo cual se ha realizado su expresión recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) (Butler y Spearman, 2014). Empleando este sistema, se ha encontrado que diversos factores del bioproceso, como son el pH, tiempo de residencia, temperatura y concentración de nutrientes, influyen en la presencia de modificaciones postraduccionales del anticuerpo, pudiendo ser procedimientos enzimáticos o químicos (Tharmalingam et al., 2014, Fan et al., 2015, Sou et al., 2015, Xie et al., 2016, Beyer et al., 2018, Tang et al., 2018). Las modificaciones enzimáticas principalmente resultan en variaciones del perfil de glicosilación y las químicas consisten en modificar los aminoácidos del anticuerpo resultando en variaciones de carga. En este sentido, dependiendo de la localización del aminoácido modificado, así como del tipo de modificación, tendrán un impacto en la función de reconocimiento del antígeno o en la función efectora del anticuerpo (Beyer et al., 2018 y Du et al., 2012).

Varios estudios han evidenciado que la potencia biológica, farmacocinética y función efectora de los AcM son frecuentemente modificados por dos parámetros: la variación en el perfil de glicosilación y las variantes de carga de las proteínas. Por lo cual se les ha considerado como atributos críticos de su calidad. Por consiguiente, varios grupos de investigación han estudiado el efecto de diferentes variables de proceso de producción de los AcM sobre los dos parámetros arriba mencionados. Para lo cual, se han empleado cultivos lote alimentados, para evaluar el efecto de: la disminución de temperatura en la fase estacionaria, diferentes medios de cultivo, diferentes líneas celulares y modificaciones del pH. (Tang et al., 2018, Xie et al., 2016, Fan et al., 2015, Sou et al., 2015 y Tharmalingam et al., 2014).

Por su parte, los cultivos continuos ofrecen la ventaja de alcanzar estados estables con condiciones de proceso, concentraciones de nutrientes, comportamiento metabólico y velocidades de crecimiento constantes, reduciendo con esto las variables presentadas en cultivos tipo lote o lote alimentado. Adicionalmente, al variar la tasa de dilución es posible modificar la velocidad de crecimiento. Para el caso de cultivos de perfusión con altas concentraciones celulares, es posible reducir el tiempo de residencia de la molécula en estudio por el alto recambio de medio de

cultivo. Por lo tanto, se consideró que este tipo de cultivos eran una metodología apropiada para estudiar el efecto de la velocidad de crecimiento sobre la calidad de un anticuerpo monoclonal.

2 ANTECEDENTES

2.1 Los anticuerpos monoclonales y la importancia de los perfiles de glicosilación y de variantes de carga

La molécula de IgG tiene un peso aproximadamente de 150 kDa y estructuralmente está compuesta de dos diferentes tipos de cadenas polipeptídicas (Figura 1), una de aproximadamente 50 kDa, llamada cadena pesada o H, y la otra de 25 kDa llamada cadena ligera o L. Cada molécula de IgG consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras, las dos cadenas pesadas están unidas entre ellas mediante puentes disulfuro, y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un puente disulfuro. En la Figura 1 se muestran los dominios del anticuerpo, donde cada cadena pesada tiene 4 dominios (V_H , CH_1 , CH_2 , CH_3) y cada cadena ligera 2 (V_L y C_L), siendo únicamente variables los dominios V_H y V_L . (Janeway et al., 2012).

Los anticuerpos tienen dos funciones. Una es la unión específica a su blanco, que se le puede llamar de reconocimiento. Y la otra es la función efectora, que consiste en reclutar células inmunitarias y moléculas para eliminar al antígeno, ya sea por fagocitosis o mediante activación del complemento. Con base en sus dos funciones, el anticuerpo puede ser dividido en 2 partes. 1) La región de unión al antígeno (Fab) que corresponde a la región final de los dos brazos de la Y (región V), la cual varía extensamente entre diferentes anticuerpos por lo que es conocida también como región variable. 2) La región que participa en la función efectora del sistema inmune, que es el vástago de la Y, que muestra una variabilidad muy baja y es conocida como la región cristalizante (Fc) (Janeway et al., 2012).

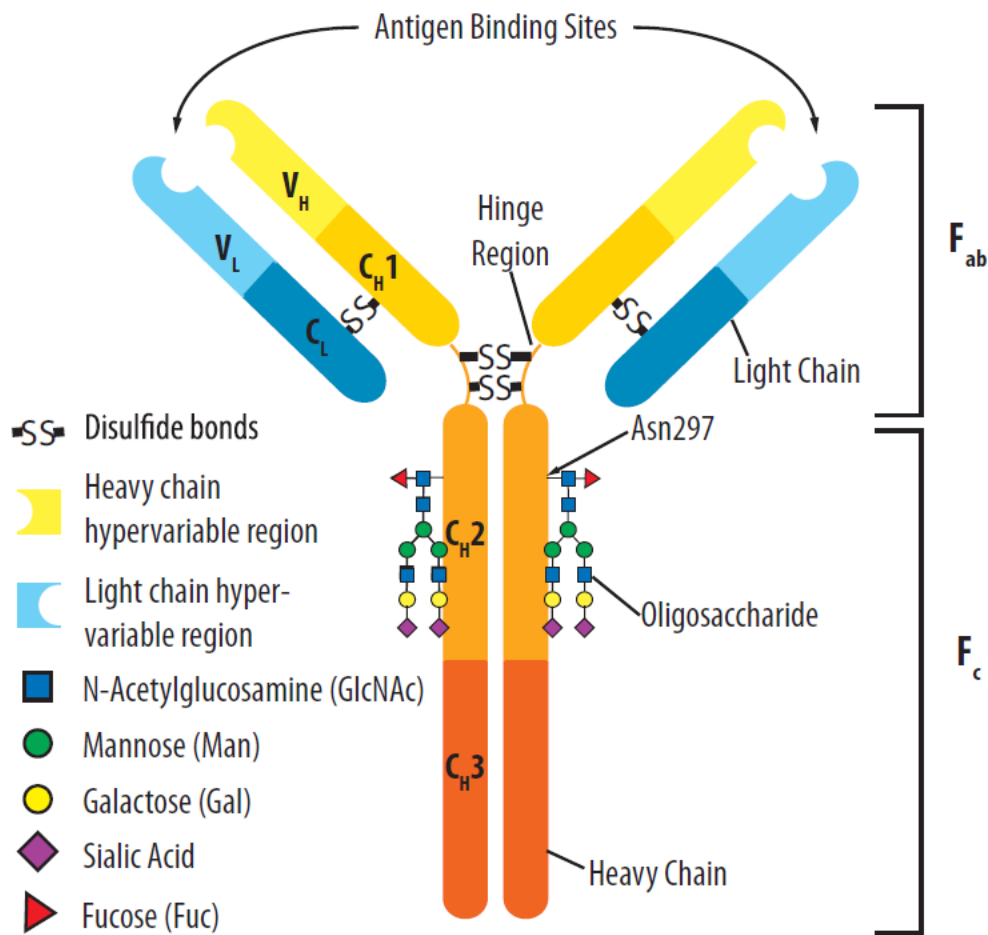


Figura 1. Esquema de IgG. La IgG está compuesta por 2 cadenas pesadas con un peso molecular de 50 kDa cada una y dos cadenas ligera de 25 kDa con un peso total de 150 kDa. (Shi y Goudar, 2014).

Los epítopos reconocidos por la fracción Fab pueden encontrarse en moléculas individuales, como toxinas, o en entidades complejas, como células. La neutralización del antígeno llevada a cabo por el anticuerpo puede ser suficiente para su función. Sin embargo, en algunos casos adicionalmente se requiere la eliminación de la molécula reconocida o en células patógenas su destrucción y eliminación. Por lo tanto, dependiendo de la acción deseada es relevante la función de la fracción Fc del anticuerpo conocida como función efectora. Dentro de los mecanismos que media la función efectora se encuentra la activación del complemento. Este inicia cuando al menos dos moléculas de IgG reconocen un antígeno y están lo suficientemente juntas con la consiguiente activación del

complemento por la vía clásica, mediante la unión de las proteínas C1q a la región Fc del anticuerpo. Subsecuentemente, se lleva a cabo la cascada de señalización que resulta en la opsonización del complejo mediante el marcaje con C3b para ser fagocitado. Adicionalmente la cascada de activación del complemento puede reclutar células fagocíticas al sitio de activación, así como promover la inflamación, y llevar a cabo la formación del complejo de ataque de membrana. El complejo de ataque de membrana genera poros en la membrana y causa la lisis celular, llamándose a este mecanismo de acción como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Janeway et al., 2012). Otro mecanismo efector de los anticuerpos es el reconocimiento de la región Fc por receptores $Fc\gamma$. Estos receptores se encuentran en células fagocíticas como los son los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, que al reconocer la región Fc llevan a cabo la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP). Adicionalmente se encuentran receptores de esta familia en células no fagocíticas del sistema inmune, como las células NK, eosinófilos, basófilos y mastocitos, las cuales secretan compuestos citotóxicos. Se ha descrito que las células NK son las principales células que llevan a cabo la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), la cual es otra función efectora que se realiza al reconocer la región FC del anticuerpo (Rogers et al., 2014, Griggs y Zinkewich, 2009 y Janeway et al., 2012). Por otra parte, la región Fc de los anticuerpos también juega un papel importante en su vida media, siendo aproximadamente de 14 a 28 días. Esto es atribuido a un mecanismo de reciclado por el receptor neonatal Fc (FcRn) que reconoce la región Fc. Al ser internalizado el AcM por pinocitosis para su proteólisis, al estar unido al receptor FcRn, este previene su liberación en los lisosomas regresándola a la circulación sistémica (Zhou y Mascelli, 2011, Janeway et al., 2012). Por otro lado, el tipo de glicano presente en la Fc del anticuerpo influye sobre la vida media. La presencia de glicanos altos en manosa coincide con vidas medias menores posiblemente por su reconocimiento por receptores para manosa, presentes en células del hígado, y que eliminan las proteínas unidas a estos azúcares terminales (Liu, 2015).

Por otro lado, se reconoce que la calidad de los productos biofarmacéuticos consiste en asegurar que el producto será eficaz y seguro. Para lo cual, es necesario conocer en primera instancia el mecanismo de acción de la molécula, así como las alteraciones que pudieran modificar su función. En términos de bioactividad, como ya se ha mencionado, la molécula debe ser específica contra su blanco, capaz de llevar a cabo la función efectora, si fuera el caso, y mantener una vida media adecuada dentro del organismo.

Dentro de las características críticas de los anticuerpos que pueden modificar su bioactividad se encuentra la microheterogeneidad, la cual es debida a modificaciones postraduccionales o modificaciones químicas durante su residencia en el cultivo. Estas alteraciones pueden realizarse por reacciones enzimáticas o químicas, donde podemos identificar dos grandes grupos. Un grupo consiste en el perfil de glicosilación que se lleva a cabo en la Asn 297 de la Fc, ya que dependiendo de la estructura de los glicanos unidos al anticuerpo presentara diferentes propiedades efectoras y farmacocinéticas. En el otro grupo se encuentran las variantes de carga que pueden estar presentes en cualquier aminoácido, ya que dependiendo donde se presenten podrán afectar en el reconocimiento del antígeno, función efectora y farmacocinética. (Beyer et al., 2018). Por lo que para garantizar la calidad y consistencia de la producción del AcM cada etapa de producción desde la expresión de la proteína hasta su almacenaje debe estar bien controlada y caracterizada (Wang et al., 2018, Jefferis, 2009).

2.2 Perfil de N-glicosilación

En la Figura 2 se muestra el proceso de N-glicosilación. Este proceso inicia en el retículo endoplásmico, donde un oligosacárido de 14 azúcares es incorporado a las proteínas nacientes en las asparaginas de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Durante el paso de la proteína por el retículo endoplásmico, sucede el proceso de plegamiento y, a su vez, mediante la acción de glicosidasas, las glucosas y algunas manosas son recortadas. Asimismo, la glicoproteína puede sufrir posteriores modificaciones en caso de pasar por el aparato de Golgi, como lo son eliminación o adiciones de azúcares mediante

la acción de glicosidasas o glicosiltransferasas. Obsérvese en la Figura 2 que el proceso de maduración en el aparato de Golgi es dependiente de la disponibilidad de azúcares nucleotídicos precursores como UDP-GlcNAc, UDP-Gal, GDP-Fuc, CMP-Sia. Además, es necesaria la presencia de transportadores que transloquen los azúcares nucleotídicos desde el citoplasma al lumen del aparato de Golgi. En la Figura están representados mediante cilindros de colores, azul para UDP-GlcNAc, rojo para GDP-Fuc, amarillo para el UDP-Gal y rojo para CMP-Sia (Varki et al., 2017).

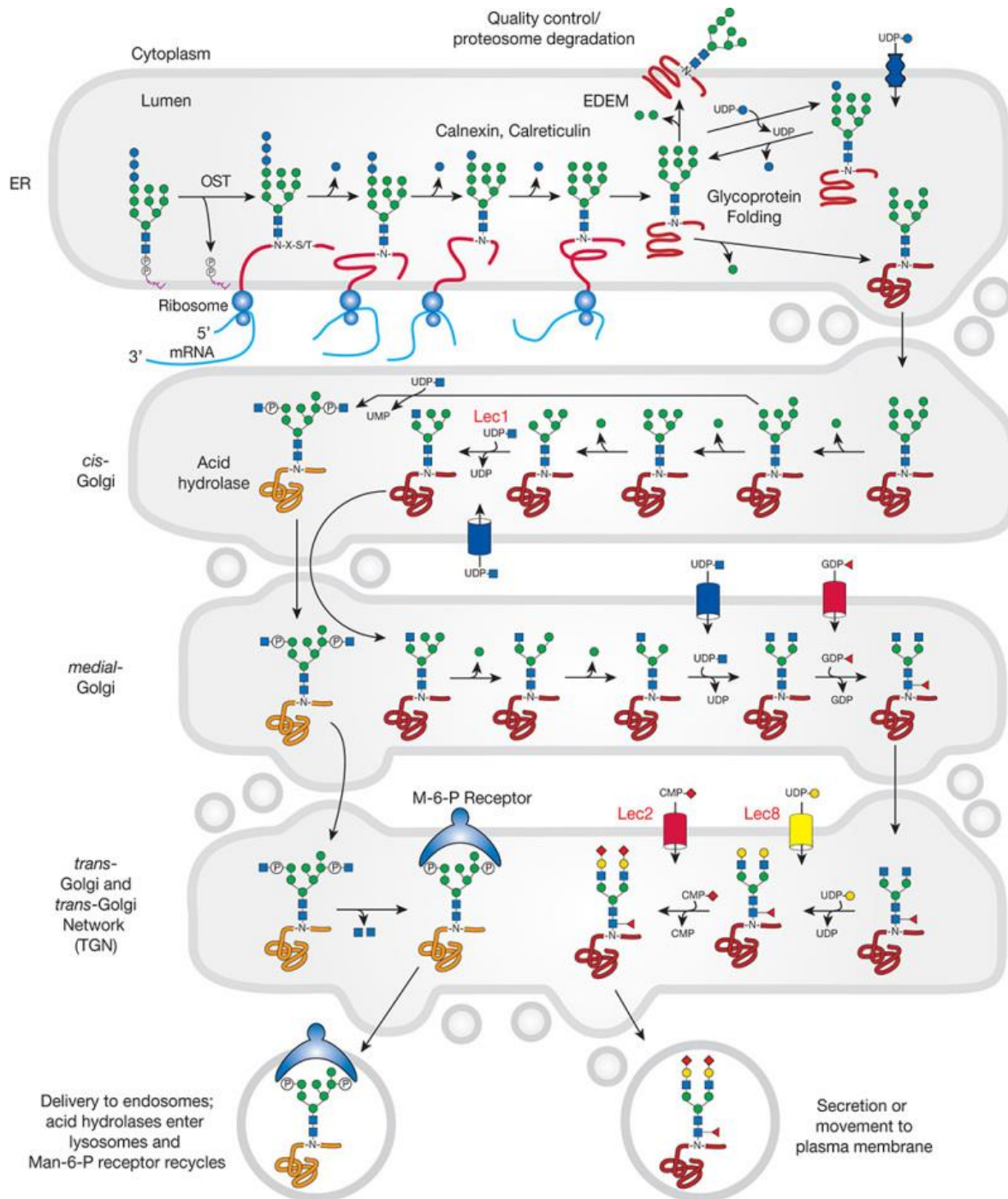


Figura 2. Glicosilación de proteínas en retículo endoplásmico y aparato de Golgi. (Varki et al., 2017).

Adicional a lo mostrado en la Figura 2, es necesaria la acción de enzimas encargadas de llevar a cabo el proceso de maduración del glicano (glicosiltransferasas y glicosidasas). En este sentido, el glicano Man9 puede ser recortado hasta Man5 por acción de la manosidasa I (ManI). El siguiente paso será

la acción de la N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI), la cual incorporará una molécula de N-acetilglucosamina. En esta etapa que ya se ha incorporado una molécula de GlcNAc pueden actuar la fucosiltransferasa (FucT) y la manosidasa II (ManII). La FucT incorporará una fucosa. La ManII continuará con el recorte de manosas. Subsecuente al recorte de manosas se incorpora otra molécula de N-acetilglucosamina por la GnTII. Posteriormente, el proceso continúa con la adición de una o dos galactosas por la galactosiltransferasa (GalT). Finalmente, se adiciona ácido siálico por la sialiltransferasa (SiaT) (Fan et al., 2015 y Varki et al., 2017).

En la Figura 3 se muestra el proceso de interconversión y activación de los glicanos que participan en el proceso de glicosilación. Entre las diferentes rutas mostradas, se reconoce que partiendo de glucosa o manosa y nucleótidos trifosfatados pueden sintetizarse todos los azúcares nucleotídicos activados involucrados en la glicosilación de los IgG1. Sin embargo, para la síntesis de UDP-GlcNAc, es necesaria, adicionalmente, la transaminación a partir de glutamina (Fan et al., 2015, Varki et al., 2017). En este sentido, adquieren un papel importante la presencia de glucosa y glutamina en los medios de cultivo para la producción de glicoproteínas recombinantes. Esto por su importancia como precursores de los esqueletos de los glicanos y como fuentes de energía.

Como ya hemos comentado, dependiendo de la estructura de los glicanos unidos al anticuerpo, este presentará diferentes propiedades efectoras y farmacocinéticas. En este sentido, la eliminación de fucosa incrementa la afinidad de los receptores FcγRIIIa de las células NK por consiguiente se incrementa la ADCC (Mimura et al., 2018). Los anticuerpos con glicanos altos en manosa incrementan la actividad ADCC pero aumentan la velocidad de su eliminación (Slade et al., 2016). La adición de ácido siálico convierte el anticuerpo en un mediador antiinflamatorio y disminuye ADCC/CDC (Mimura et al., 2018, Kai-Ting et al., 2013). La galactosilación incrementa ADCC/CDC/ADCP. En cambio, la ausencia de galactosa reduce la ADCC/CDC/ADCP (Houde et al., 2010, Hodoniczky et al., 2005 y Chung et al., 2014). Finalmente, se recomienda el empleo de anticuerpos no glicosilados cuando no es requerida la función efectora ADCC/CDC, que es el caso de anticuerpos neutralizantes agonistas o antagonistas.

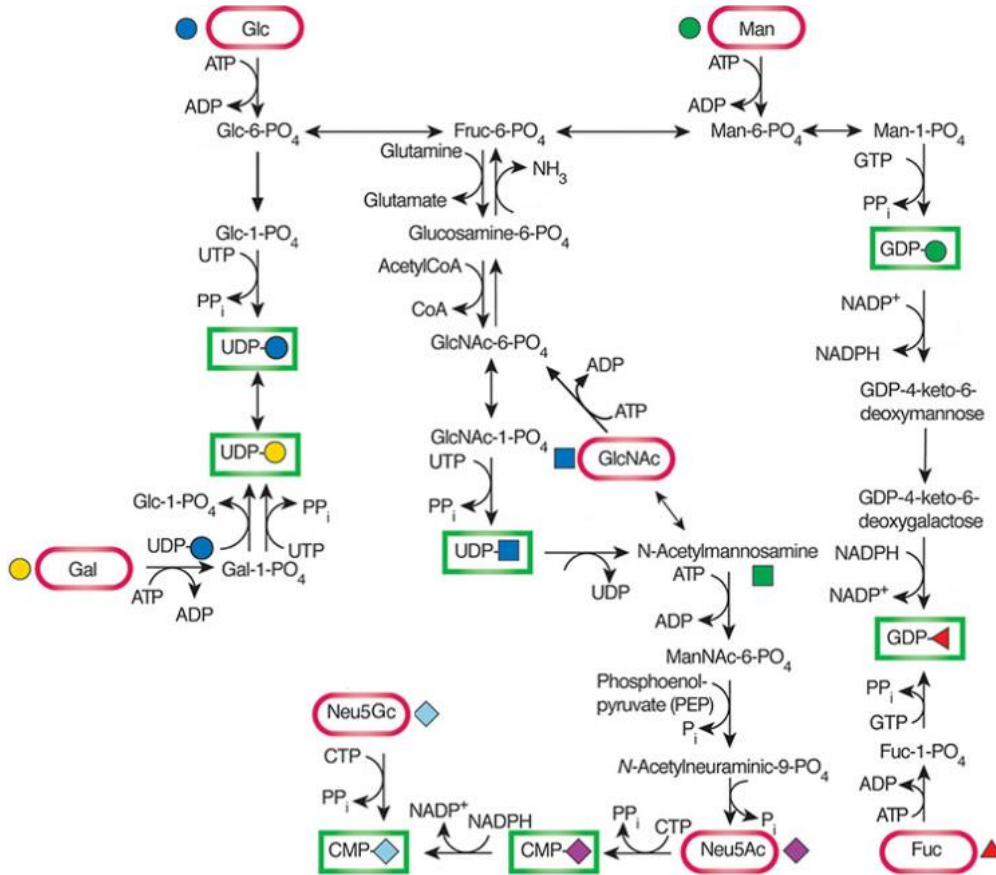


Figura 3. Biosíntesis e interconversión de monosacáridos en células de mamífero (Modificado de Varki et al., 2017). Se incluyen las rutas de interconversión de los principales monosacáridos encontrados en IgG1. En óvalos rojos se muestran los distintos monosacáridos, los cuales podrían sintetizarse a partir de glucosa o manosa, o pudieran ser obtenidos extracelularmente. Los rectángulos verdes representan los distintos azúcares nucleotídicos activados involucrados en el proceso de glicosilación. Es posible la presencia de dos especies de ácido siálico (Neu5Gc y Neu5Ac) (Ghaderi et al., 2012, Sou et al., 2015, Varki et al., 2017).

2.3 Variantes de carga

Las modificaciones de carga son el resultado de modificaciones postraduccionales o de degradación pudiendo ser químicas o enzimáticas (Kawhli et al., 2010, Bucama et al., 2012 y Du et al., 2012). Las variantes de carga se han clasificado en 3 grupos con base en su separación por cromatografía de intercambio catiónico. La primera fracción en eluir se le ha identificado como variantes ácidas, la segunda como fracción principal y al última como variantes básicas (Du et al., 2012).

La presencia de variantes de carga del anticuerpo es un atributo de calidad importante. Esto porque, la heterogeneidad de cargas puede modificar su estructura, estabilidad, propiedades químicas y afinidad de unión a sus receptores,

y por consiguiente su actividad biológica (Khawli et al., 2010, Miao et al., 2017) por consiguiente, tiene efecto sustancial sobre las propiedades funcionales del anticuerpo. Se ha demostrado, al utilizar anticuerpos químicamente modificados, que las variaciones de carga pueden modificar las propiedades de unión a las proteínas o células blanco, afectando su penetración a tejidos, distribución y farmacocinética. Los efectos de las variaciones de carga son altamente dependientes de la naturaleza de la modificación, localización, y del grado de modificaciones presentes. La localización resulta crítica en caso de encontrarse en la región Fab de reconocimiento del antígeno o en la región Fc, mediadora de la función efectora (Du et al., 2012). Khawli y colaboradores (2010) realizaron estudios farmacocinéticos en ratas de las variantes ácidas, básica y especies principales, no encontrando diferencias. En cuanto a la función de unión al antígeno, Tang y colaboradores (2018) encontraron disminución de la afinidad en las variantes ácidas y básicas con respecto a la afinidad del anticuerpo sin fraccionar, encontrando además mayor afinidad en la especie principal purificada. Boswell y colaboradores (2010) propusieron que la heterogeneidad de cargas pudiera modificar las interacciones electrostáticas del AcM con las membranas celulares y modificar la farmacocinética del anticuerpo. Se han observado diferentes comportamientos farmacocinéticos al variar el punto isoeléctrico del AcM en más de una unidad. Donde cada fracción de variantes de carga tiene una distribución tisular y vida media diferente (Boswell et al., 2010).

Tang y colaboradores (2018) propusieron que las variantes de carga ácidas, básicas y la variante principal son generadas intracelularmente, y una vez secretadas, la fracción principal es degradada para formar variantes de carga ácidas. Las especies principales no necesariamente corresponden a la forma sin modificación o sin degradación del anticuerpo. Sino que típicamente consisten en especies con modificaciones postraduccionales de ciclización en la glutamina N-terminal para generar piroglutamato y de remoción de las lisinas C-terminales. Las especies principales han sido utilizadas como control para la caracterización detallada de las variantes ácidas y básicas (Du et al., 2012). Se ha descrito que las variantes ácidas pudieran resultar de reacciones de: desamidación, glicación, sialilación o

cisteinilación (Tang et al., 2018, Miao et al., 2017 y Khawli et al., 2010). Se ha reconocido a la desamidación de la asparagina la principal causa de generación de variantes de carga ácidas. Esta modificación depende de la estructura primaria, siendo más favorable al estar cercana a residuos de glicina y serina (Tang et al., 2018, Xie et al., 2016 y Miao et al., 2017). Se ha descrito que la desamidación de la asparagina es una especie de reloj molecular de las proteínas, ya que este proceso ocurre desde su síntesis y aumenta durante la vida de la proteína (Tang et al., 2018). Entre los mecanismos que originan el incremento de variantes de carga básicas se encuentran: la preservación lisinas carboxilo terminales de la fracción cristalizable (Antes et al., 2007 y Torkashvand y Vaziri, 2016), formación de succinimida de la isomerización del aspartato, oxidación de aminoácidos y amidación en el carboxilo terminal (Miao et al., 2017).

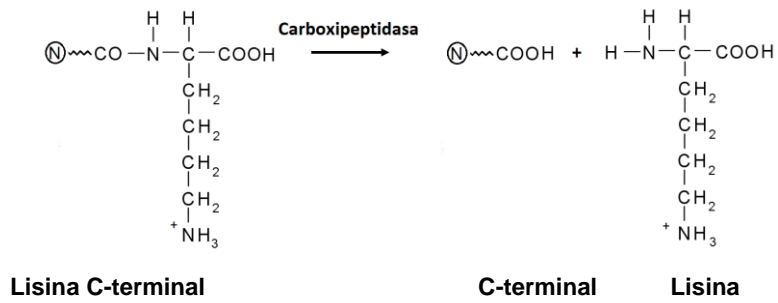
En la Figura 4 se muestran las reacciones involucradas en la generación de especies encontradas en la fracción principal. Estas especies pueden originarse por distintas modificaciones. Las lisinas C-terminales, pueden ser removidas total o parcialmente por carboxipeptidasas. Es de mencionar, que la secuencia genética de las cadenas pesadas en el extremo C-terminal codifica para lisinas. Por otro lado, el primer aminoácido de la cadena pesada puede ser glutamato o glutamina, y el primero de las cadenas ligeras lambda usualmente es glutamina. En el caso de las glutaminas N-terminales pueden ser ciclizadas para generar piroglutamato que no ocasiona modificación de carga, pero ha sido aislado en la fracción principal (Liu et al., 2007 y Liu et al., 2011).

En la Figura 5 se muestran las reacciones involucradas en la generación de especies encontradas en la fracción ácida. En la reacción de desamidación de la asparagina se pierde un grupo amino con la obtención de aspartato o isoaspartato que suman una carga negativa al polipéptido (Shahrokh et al., 1994, Catak et al., 2006). La glicación consiste en la reacción de residuos de lisina con azúcares reductores como glucosa, fructosa o galactosa, eliminando una carga positiva (Mo et al., 2018, Goetze et al., 2011). La sialilación es una reacción enzimática realizada en el aparato de Golgi que consiste en la incorporación de un ácido siálico que aporta una carga negativa. La cisteinilización consiste en la formación de un puente

disulfuro de las cisteínas sin reaccionar del AcM con una cisteína libre. Este tipo de modificación pudiera encontrarse en la región variable del anticuerpo. Banks y colaboradores (2007) propusieron que la retención de esta isoforma en la fracción ácida pudiera deberse a cambios estructurales inducidos por la cisteinilización que ocasionan la exposición de residuos ácidos.

En la Figura 6 se muestran las reacciones involucradas en la generación de especies encontradas en la fracción básica. Una especie es la que tuvo escisión incompleta de lisinas C-terminales, ya que la presencia de cada lisina contribuye con una carga positiva. La succimida es un intermediario en la reacción de formación de isoaspartato, su formación implica la pérdida de una carga negativa (Harris et al., 2001 y Shahrokh et al., 1994). La metionina es el aminoácido más propenso a oxidación. Chumsae y colaboradores (2006) propusieron que la oxidación de la metionina causa cambios conformacionales que pueden reflejarse en distribución de cargas locales. Esto ocasiona un cambio de tiempo de retención, explicando de esta manera el incremento del tiempo de retención ocasionado por esta isoforma. El extremo carboxilo terminal de las cadenas pesadas contiene la secuencia PGK. Donde mediante la acción de la carboxipeptidasa la lisina es escindida, quedando prolina y glicina. Estas últimas pueden modificarse mediante la acción de la PAM (peptidilglicina-amidasa monooxigenasa). PAM elimina la glicina y amida a la prolina terminal con la sustitución de una carga negativa del carboxilo por una positiva del grupo amino. (Prigge et al., 2000 y Liu et al., 2007).

Remoción de lisina carboxilo terminal



Ciclación de la glutamina amino terminal

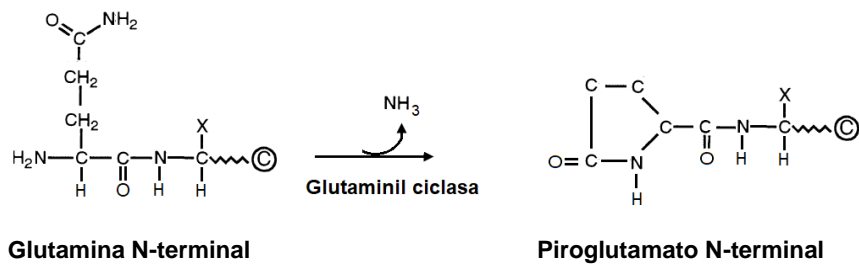
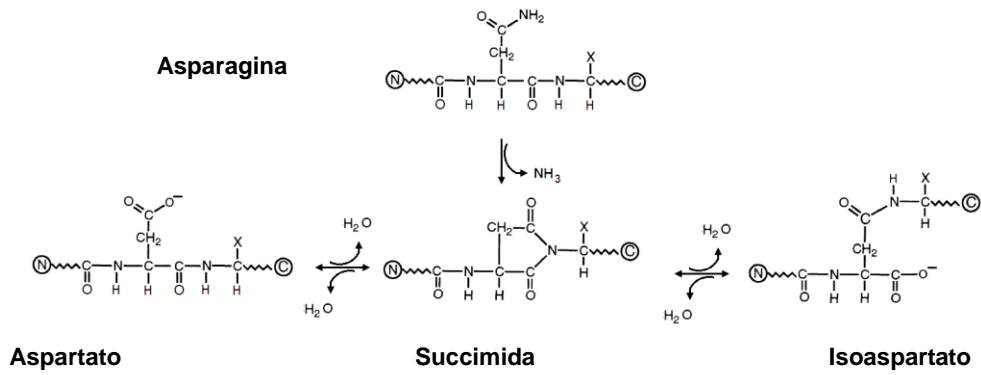
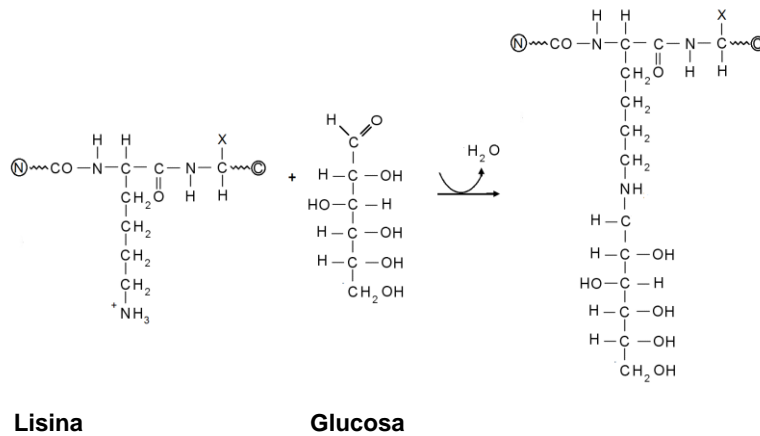


Figura 4. Reacciones involucradas en la generación de variantes de carga encontradas en la fracción principal, separada por cromatografía de intercambio catiónico.

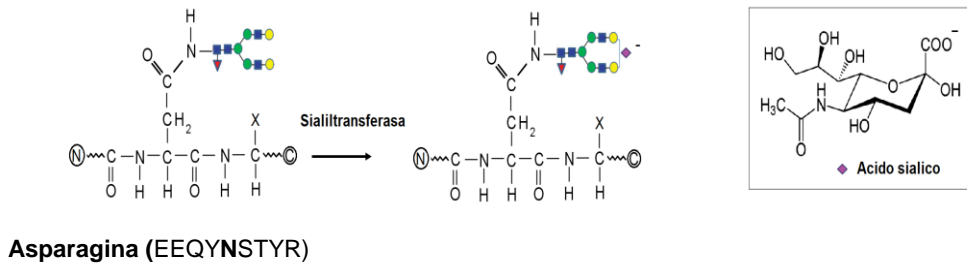
Desamidación



Glicación



Sialilación



Cisteinilación

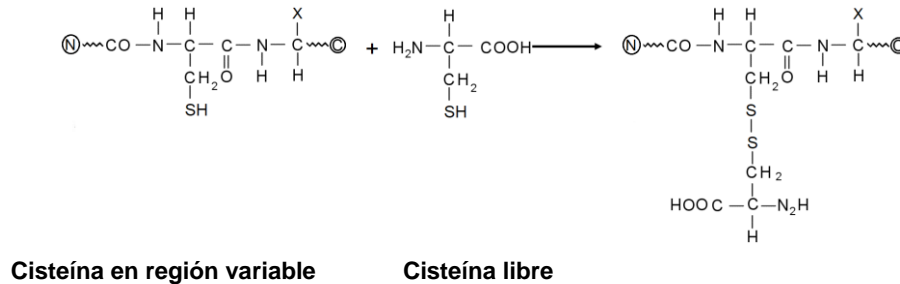


Figura 5. Reacciones involucradas en la generación de variantes de carga encontradas en la fracción ácida, separada por cromatografía de intercambio catiónico.

pesada respectivamente (Eldert, 1998). Algunos aminoácidos sufren modificaciones postraduccionales que resultan en variantes de carga. El primer aminoácido de la cadena pesada puede ser glutamato o glutamina, y el primero de las cadenas ligeras lambda usualmente es glutamina, la cual puede ser ciclizada para generar piroglutamato (Liu et al., 2007). Cerca del aminoácido 300 de la cadena pesada se encuentra la secuencia consenso EEQYNSTYR que es glicosilada en la asparagina (Perdivara et al., 2009). En el extremo C-terminal se encuentra la secuencia PGK donde la lisina puede ser escindida y la prolina puede ser amidada. La desaminación de la asparagina ha sido descrita como un reloj molecular de las proteínas. La desaminación de Asp es más susceptible al estar unida en su extremo carboxilo a glicina, serina e histidina (Robinson y Robinson, 2001). La metionina ha sido descrita como el aminoácido más susceptible a oxidarse.

Cadena pesada

1	Q VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG M HWVRQAPGKGLEWVAAIWYDGSNKYY	60
61	ADSVKGRFTISRDN S KNTLY M Q M NSLRAEDTAVYYCAREGRWVRYTTVTTIGYYFDYWGQ	120
121	GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW N S G ALTSGVHT	180
181	FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV N H K PSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPC	240
241	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL M ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT	300
301	KPRE E E Q YN S TYR V VSVLTVLHQDWL N G K EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY	360
361	TLPPSREEM M TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES N G Q PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK	420
421	LTVDKSRWQQGNVFSQSV M HEALH N H Y TQKSLSL S PG K	458

Cadena ligera

1	Q SVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGTSSNIGSSSTVNWYQQL P G M APKLLIYRD A MRPSGVP	60
61	DRFSGSKSGASASLAIGGLQSEDETDYYCAAWDVSLNAYVFGTGTKVTVLGQPKANPTVT	120
121	LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASS	180
181	YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	215

Figura 7. Estructura primaria de un IgG1 humano típico (NCBI, 2018). El extremo amino corresponde al aminoácido 1, y el carboxilo al otro extremo. Se muestran en negritas los sitios conservados más comunes susceptibles a modificaciones postraduccionales que generan variantes de carga.

2.4 Factores celulares y de proceso que influyen en la producción y perfiles de glicofomas y de variantes de carga del AcM

2.4.1 Velocidad de crecimiento

Diversos autores han encontrado que, la velocidad de crecimiento (μ) de las células productoras determina la cantidad del AcM producido. Ramírez y Mutharasan (1990) estudiaron cultivos semicontinuos de células de híbridoma para producción de AcM. Obtuvieron máximas velocidades de producción de AcM en células en la fase G1 del ciclo celular. Adicionalmente observaron que al incrementar la tasa de dilución disminuyó la velocidad de producción de AcM y se incrementó la velocidad de crecimiento celular. Vergara y colaboradores (2014) estudiaron cultivos de células

CHO productoras del activador tisular del plasminógeno en quimiostato. Encontraron que al reducir la tasa de dilución en condiciones de hipotermia moderada (33°C) se promueve un incremento en la producción de proteína recombinante. Finalmente, sugirieron que las condiciones de hipotermia y valores pequeños de μ promueven una mayor productividad. Li y colaboradores (2013) estudiaron cultivos continuos de células CHO a diferentes tasas de dilución, de 0.2 d⁻¹ a 0.65 d⁻¹. Encontraron que a menores tasas de dilución un mayor porcentaje de células (78.1% y 48.4% respectivamente) se encuentran en las fases G1/G0. Andersen y colaboradores (2000) reportaron que la reducción de la velocidad de crecimiento celular favorece la glicosilación del activador tisular del plasminógeno producido en células CHO. Lipscomb y colaboradores (2005) estudiaron la glicosilación en fosfatasa alcalina producida en células CHO. Encontraron disminución de manosas terminales e incremento de sialilación a bajas velocidades específicas de crecimiento en un cultivo de perfusión, en comparación con un cultivo tipo lote con altas velocidades específicas de crecimiento. Bedoya y colaboradores (2016) estudiaron el efecto de la reducción de la temperatura de 37°C a 30°C sobre la transcripción en cultivos de células CHO productoras del activador tisular del plasminógeno, el cual es una proteína glicosilada. Donde encontraron que, al reducir la temperatura, se reduce la velocidad específica de crecimiento de 0.552 d⁻¹ a 0.12 d⁻¹. Adicionalmente encontraron un incremento en la productividad de proteína. Propusieron que esto pudiera estar correlacionado con variaciones en la expresión de genes involucrados en las modificaciones postraduccionales en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Lo cual causa cambios en la productividad. En este apartado se mencionaron ejemplos de estudios de cultivos en los que se modificó la velocidad específica de crecimiento. En los cuales, estudiaron la relación de la velocidad de crecimiento con la productividad, así como la glicosilación de la fosfatasa alcalina y el activador tisular del plasminógeno. Estas proteínas tienen un perfil de glicosilación distinto al de las inmunoglobulinas G. En la revisión bibliográfica, no se encontraron estudios que relacionen la velocidad de crecimiento con la generación de variantes de carga, ni que relacionen la velocidad de crecimiento con la glicosilación de anticuerpos.

2.4.2 Medio de cultivo y nutrientes

El perfil de glicosilación, así como la distribución de variantes de carga son impactadas por múltiples factores, incluyendo la composición del medio de cultivo, metabolitos y condiciones del proceso, los cuales serán mencionados en este apartado. Iniciaremos describiendo los factores que afectan la glicosilación. En cuanto a la composición del medio de cultivo, se ha reportado que la limitación de nutrientes afecta las etapas iniciales del proceso de glucosilación, al estar limitada la glutamina disminuye la disponibilidad de UDP-GlcNAc. La limitación de glucosa o una alteración de su metabolismo reduce la disponibilidad de UDP-Gal (Fan et al., 2015). La limitación de UDP-GlcNAc tiene como consecuencia la baja actividad de la GnTI, que ocasiona el bajo procesamiento de la glicoproteína incrementando los manosa 5 y decreciendo los glicanos con modificaciones subsecuentes, como lo son los galactosilados y sialidados. Por otro lado, la presencia de metabolitos tóxicos puede inactivar a las proteínas involucradas en el proceso de glicosilación. Se ha reportado que concentraciones de amonio superiores a 10 mM, incrementan el pH del medio de cultivo. Este incremento causa inactividad de las glicosiltransferasas, reduciéndose la disponibilidad de UDP-GlcNAc en el aparato de Golgi. Lo que ocasiona la disminución de la galactosilación y sialilación (Fan et al., 2015, Yang y Butler, 2000). En cuanto a las condiciones del proceso, se ha reportado que el incremento del pH trae como resultado el decremento de la galactosilación y sialilación terminal, así como de la proporción de estructuras fucosiladas (Ivarsson et al., 2014). Schmelzer y Miller (2000) demostraron que las condiciones hiperosmóticas, así como la hipercapnia, reducen la sialilación de la molécula de adhesión neural. La reducción de la temperatura del cultivo incrementa el grado de sialilación (Palomares et al., 2004). En cuanto a las condiciones metabólicas, se ha propuesto que la baja productividad puede resultar en el incremento de la galactosilación (Fan et al., 2015).

En cuanto a los factores que afectan la distribución de variantes de carga, existen varios estudios donde bajo diferentes condiciones han encontrado en mayor o

menor medida la generación de variantes ácidas a partir de la fracción principal. En los cuales no han encontrado incremento de variantes básicas extracelularmente. Tang y colaboradores (2018) estudiaron la degradación de la fracción principal. Encontraron que se degrada en diferentes proporciones en diferentes formulaciones de medio de cultivo fresco, siendo menor la degradación en PBS (pH 7.0). Adicionalmente, estudiaron varias condiciones *in vitro*, encontrando que el tiempo de residencia y la temperatura incrementan la generación de variantes de carga ácidas. Por otro lado, Xie y colaboradores (2016) encontraron que al reducir el pH del medio de cultivo de 6.95 ± 0.1 a 6.75 ± 0.1 , se redujo la degradación de la fracción principal hacia variantes ácidas. Donde, obtuvieron 25% de abundancia relativa de isoformas ácidas al pH de 6.95 y de 19% al pH de 6.75. Otro factor que ha sido reportado que incrementa la generación de variantes de carga ácidas es la exposición a la luz (Xie et al., 2016). En cuanto a las condiciones metabólicas, Hossler y colaboradores (2015) encontraron que la baja viabilidad de los cultivos incrementa la abundancia relativa de variantes de carga ácidas. En este sentido, propusieron que al morir las células su contenido intracelular (conteniendo proteínas, enzimas y compuestos óxido reductores) es liberado al cultivo, lo que favorece la formación de variantes ácidas.

2.5 Formas de caracterizar el efecto

Se han realizado varios trabajos en los últimos años cuyo objetivo ha sido estudiar diferentes condiciones de proceso para la producción de AcM. Se han estudiado diferentes modificaciones al proceso como lo son: cambios de temperatura en fase estacionaria, cambio del pH, suplementación con aditivos, estudio de diferentes medios de cultivo y el uso de sistemas de perfusión. Mediante estos estudios se ha buscado entender el efecto de las variaciones de proceso, de manera independiente, en diferentes aspectos. Por un lado, sobre el perfil de glicosilación, otros sobre la generación de variantes de carga, y otros sobre el tiempo de viabilidad del cultivo y la productividad. A continuación, se menciona brevemente algunos estudios realizados recientemente.

Sou y colaboradores (2015) estudiaron la glicosilación de células CHO productoras de IgG en cultivos lote alimentado. Compararon dos cultivos que iniciaron a 36.5°C reduciendo la temperatura a 32°C en uno de ellos al inicio de la fase estacionaria. Obtuvieron mayor productividad en el cultivo con cambio de temperatura, pero incrementándose también los glicanos de bajo procesamiento G0, G0F, reduciéndose G1F y G2F. El cambio del perfil de glicosilación relacionó con la reducción del consumo de glucosa al reducir la temperatura. Adicionalmente encontraron reducción de UDP-Glc, UDP-Gal y UDP-GlcNAc, así como reducción en la expresión de transcritos de las glicosiltransferasas GnTII, GalTI y Beta-GalTIII en el cultivo con cambio de temperatura. Fan y colaboradores (2015) estudiaron la glicosilación de células CHO productoras de IgG en cultivos lote alimentado. Su estudio consistió en comparar dos líneas celulares y dos medios de cultivo diferentes. Iniciaron el cultivo a 37°C y redujeron la temperatura a 33.5°C a los 5 días. Encontraron que la línea celular con menor productividad presentó mayor galactosilación. Adicionalmente, encontraron incremento de manosa 5 a baja concentración de glutamina relacionándolo con limitación de UDP-GlcNAc. Tharmalingam y colaboradores (2014) estudiaron cultivos tipo lote alimentado con células CHO productoras de un anticuerpo. Estudiaron la suplementación de manganeso en el cultivo a partir del día 5 teniendo como control un cultivo sin suplemento. Encontraron que durante la fase exponencial del crecimiento hubo una abundancia relativa constante de glicanos fucosilados en el orden del 90%, y una baja proporción de glicanos altos en manosas. Sin embargo, al terminar la fase estacionaria y entrar a la fase de muerte se observó un aumento en la proporción de glicanos altos en manosa y un decremento de las formas fucosiladas. Encontraron que el manganeso incrementó ligeramente la galactosilación y causó un incremento de glicanos altos en manosa (M6, M7 y M8), en comparación con el cultivo sin manganeso.

Xie y colaboradores (2016) estudiaron cultivos lote alimentados con células CHO productoras de IgG1, a 37°C, con un pH inicial de 6.95. Llevaron a término un cultivo al pH inicial y redujeron el pH de otro a 6.75 a los 6 días. Encontraron que la reducción del pH decrece la galactosilación, así como el contenido de variantes

ácidas, al disminuir la reducción de puentes disulfuro, la galactosilación y la deamidación. Adicionalmente observaron que conforme avanzó el tiempo del cultivo, en ambos pH se redujo la fracción de las variantes principales e incrementaron las variantes ácidas, siendo mayor el cambio en el pH más alto. Tang y colaboradores (2018) estudiaron las condiciones de generación *in vitro* de variantes de carga. Para lo cual, fraccionaron las variantes ácidas, básicas y principal de un anticuerpo producido en un cultivo de células CHO en cultivo lote alimentado a 37°C. Incubaron la variante principal en diferentes condiciones: en medio de cultivo gastado obtenido a diferentes días, en PBS, en diferentes medios de cultivo, a diferentes concentraciones de anticuerpo, en medio gastado y a diferentes temperaturas en medio de cultivo gastado. Encontraron que la menor degradación se tuvo al incubar en PBS. Por otro lado, las degradaciones en medio fresco y medio de cultivo gastado fueron similares, por lo que descartaron una degradación enzimática. La degradación se redujo al incrementar la concentración del anticuerpo y se incrementó a mayor temperatura. Observaron diferentes grados de degradación al incubar en diferentes formulaciones de medio de cultivo fresco. Clincke y colaboradores (2013) estudiaron cultivos en modo de perfusión con una línea celular de células CHO productora de AcM. El sistema de retención celular consistió en el uso de filtros de fibra hueca en el modo de ATF (filtración de flujo tangencial alternante) así como TFF (filtración de flujo tangencial). Lograron alcanzar cultivos celulares con densidades de 2.14×10^8 células/mL, utilizando una tasa de dilución de 10 volúmenes de reactor por día. El crecimiento cesó a esa densidad celular a los 44 días de cultivo.

Analizando todos estos casos de estudio, podemos observar que los diferentes autores han tenido objetivos diferentes, enfocándose en comparar condiciones de cultivo. Con este tipo de estudios ha sido posible conocer como ciertos factores afectan la productividad, los perfiles de glicosilación o las de variantes de carga de los AcMs. Sin embargo, ninguno de ellos se ha enfocado en el efecto de la velocidad de crecimiento sobre el perfil de glicosilación del AcM, y la distribución de variantes de carga.

2.6 Perspectivas para el control de la velocidad específica de crecimiento

En este trabajo se estudió como variable independiente la velocidad específica de crecimiento, y como variable dependiente, la distribución de variantes de carga y perfil de glicosilación. Para lograr esto fue importante desarrollar estrategias para controlar de manera adecuada la velocidad de crecimiento del cultivo para poder evaluar la posible relación entre las variables.

La aplicación del concepto de que la velocidad de crecimiento depende de las concentraciones de nutrientes. Y que las concentraciones de nutrientes son modificadas al variar la tasa de dilución en cultivos continuos. Fue esencial para controlar la velocidad específica de crecimiento celular en los cultivos continuos estudiados y responder las preguntas de investigación.

En los quimiostatos, al existir un nutriente limitante, se ajusta la densidad celular y se alcanza un estado estable. En cambio, en los reactores de perfusión, la densidad celular es determinada por la tasa de dilución y por la retención celular (Ozturk, 1996). Para determinar la alimentación en cultivos de perfusión, Clincke y colaboradores (2013) utilizaron el concepto de velocidad específica de perfusión celular (VEPC). La cual representa el volumen por célula que debe ser renovado diariamente. Ellos seleccionaron el valor de 0.05 nL/célula/día, pudiendo variar entre 0.05 y 0.5 nL/célula/día. Adicionalmente, adicionaron glucosa y glutamina conforme se requirió, para evitar el alto consumo de medio. La aplicación de esta estrategia de alimentación puede ser realizada con base en la ecuación 1 a partir de la cual se determina una tasa de dilución recomendada con base en la densidad celular del cultivo y a la VEPC. En este proyecto a partir de los cultivos semicontinuos en matraz se obtuvo un parámetro similar que fue llamado velocidad de consumo de medio de cultivo por célula. El cual fue utilizado para definir la tasa de dilución de los cultivos de perfusión, obteniéndose concentraciones celulares predefinidas a las velocidades de crecimiento objetivo.

$$VEPC = \frac{D}{X}$$

Ec. 1

$$VEPC(X) = D$$

3 JUSTIFICACIÓN

Varios estudios previos han confirmado que la modificación del perfil de glicosilación y de la distribución de variantes de carga de IgG puede influir en su potencia biológica, farmacocinética y función efectora en los pacientes. En este sentido, varios factores que influyen en el perfil de glicosilación han sido estudiados. Sin embargo, actualmente se desconoce el efecto que pueda tener la velocidad específica de crecimiento sobre el perfil de glicosilación y distribución de variantes de carga en AcM. En caso de existir un efecto, se tendría la posibilidad de producir AcM a velocidades de crecimiento específicas que favorezcan la obtención de perfiles de glicosilación predefinidos. Donde, dependiendo de la función efectora requerida en el padecimiento a tratar con el AcM se definiría el perfil de glicosilación óptimo. Adicionalmente, es deseable evitar condiciones que favorezcan el incremento de glicanos altos en manosa que disminuyen la vida media del anticuerpo. Por otro lado, en cuanto a la distribución de variantes de carga, es deseable obtener mayoritariamente la fracción principal por ser la fracción de mayor potencia. En este sentido, el conocimiento del efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre las variantes de carga permitiría producir el AcM en las condiciones que abunde la fracción principal.

4 HIPÓTESIS

La velocidad específica de crecimiento celular determina los perfiles de glicosilación y de variantes de carga de un anticuerpo monoclonal recombinante en cultivo.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- 5.1.1 Conocer el efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre el metabolismo y los perfiles de glicosilación y de variantes de carga del AcM en cultivos continuos.

5.2 Objetivos particulares

- 5.2.1 Desarrollar estrategias para estudiar el efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre los perfiles de glicosilación y de variantes de carga del AcM en cultivos continuos.
- 5.2.2 Evaluar el comportamiento del metabolismo celular a diferentes velocidades específicas de crecimiento.
- 5.2.3 Evaluar los perfiles de glicosilación y de variantes de carga del AcM producido a diferentes velocidades específicas de crecimiento.
- 5.2.4 Evaluar la productividad y rendimiento a diferentes velocidades específicas de crecimiento.

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Línea celular y medio de cultivo

Se utilizaron células de ovario de hámster chino (CHO K1) productoras de un anticuerpo monoclonal IgG1. Se utilizó un medio de cultivo comercial en polvo definido químicamente (no declarado por confidencialidad del proyecto), diseñado para el crecimiento de células CHO y la producción de AcM. El medio fue preparado en el laboratorio, esterilizado mediante filtración y conservado en refrigeración hasta el momento de su uso. El medio de cultivo fue libre de glutamina, la que fue suplementada antes de su uso a una concentración final de 6 mM. Asimismo, se determinó que el medio de cultivo tuvo una concentración basal de 33.3 mM de glucosa, 1.56 mM de glutamato, ausencia de lactato y de amonio.

6.2 Características de los cultivos estudiados

Durante el desarrollo de este proyecto se realizaron 5 cultivos. Un cultivo tipo lote en matraz Erlenmeyer por duplicado, dos de manera semicontinua en matraces Erlenmeyer por duplicado y dos de manera continua en reactor. Se muestran las características de los cultivos en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los cultivos estudiados. Se muestran los diferentes tipos de cultivos estudiados y el esquema de alimentación de cada uno de ellos. Asimismo, el esquema de recambio de medio de cultivo.

Cultivo	Sistema de estudio	Esquema de alimentación	Extracción de medio
Tipo lote	Matraz agitado	NA	NA
Matraz 60% μ_{max}	Matraz agitado	Semicontinuo (2 veces por día)	Semicontinuo (2 veces por día)
Matraz 10% μ_{max}	Matraz agitado	Semicontinuo (2 veces por día)	Semicontinuo (2 veces por día)
Perfusión 50% μ_{max}	Biorreactor/perfusión	Continuo	Continua
Perfusión 20% μ_{max}	Biorreactor/perfusión	Continuo	Continua

6.3 Cultivos tipo lote en matraz Erlenmeyer

Se realizó un cultivo tipo lote por duplicado, en matraces de 500 mL con un volumen de cultivo de 100 mL. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con agitación Eppendorf New Brunswick 541i a 120 rpm a 37°C y una concentración de 5% de CO₂. Se realizaron muestreos dos veces al día, determinándose cuenta celular y viabilidad. También, se extrajeron muestras para el análisis de metabolitos, las cuales fueron conservadas a -20°C hasta el momento del análisis. El criterio para dar por terminado el cultivo fue la obtención de una viabilidad celular menor al 75%.

6.4 Cultivos semicontinuos en matraz Erlenmeyer

Se diseñó un experimento para conocer la influencia de la tasa de dilución y la concentración celular inicial sobre el perfil de glicofomas y de variantes de carga del anticuerpo en matraces agitados en la modalidad semicontinua. Se elaboró un diseño de experimentos 2² que consistió en estudiar 2 variables con dos concentraciones, la concentración celular inicial y la tasa de dilución. Esto resultó en 4 combinaciones, dos de ellas con una concentración celular inicial de 5x10⁶ cel/mL y 2 con concentración inicial de 1x10⁷ cel/mL, y tasas de dilución de 0.1 d⁻¹ y 0.5 d⁻¹. Los cultivos fueron realizados en matraces Erlenmeyer mantenidos en una incubadora con agitación Eppendorf New Brunswick 541i a 120 rpm a 37°C y una concentración de 5% de CO₂.

6.4.1 Recambio de medio de cultivo y toma de muestras

Una vez que se obtuvo la concentración celular objetivo, se inició el esquema de recambio simulando un quimiostato, donde se realizó el recambio de medio 2 veces al día. El volumen recambiado se calculó de acuerdo a la ecuación 2.

$$V_r = D(V_c)(tC) \quad \text{Ec. 2}$$

Donde V_r es el volumen de recambio, D es la tasa de dilución, expresada en veces de reactor por día, V_c es el volumen de medio de cultivo en el reactor, tC es el tiempo considerado para el siguiente recambio.

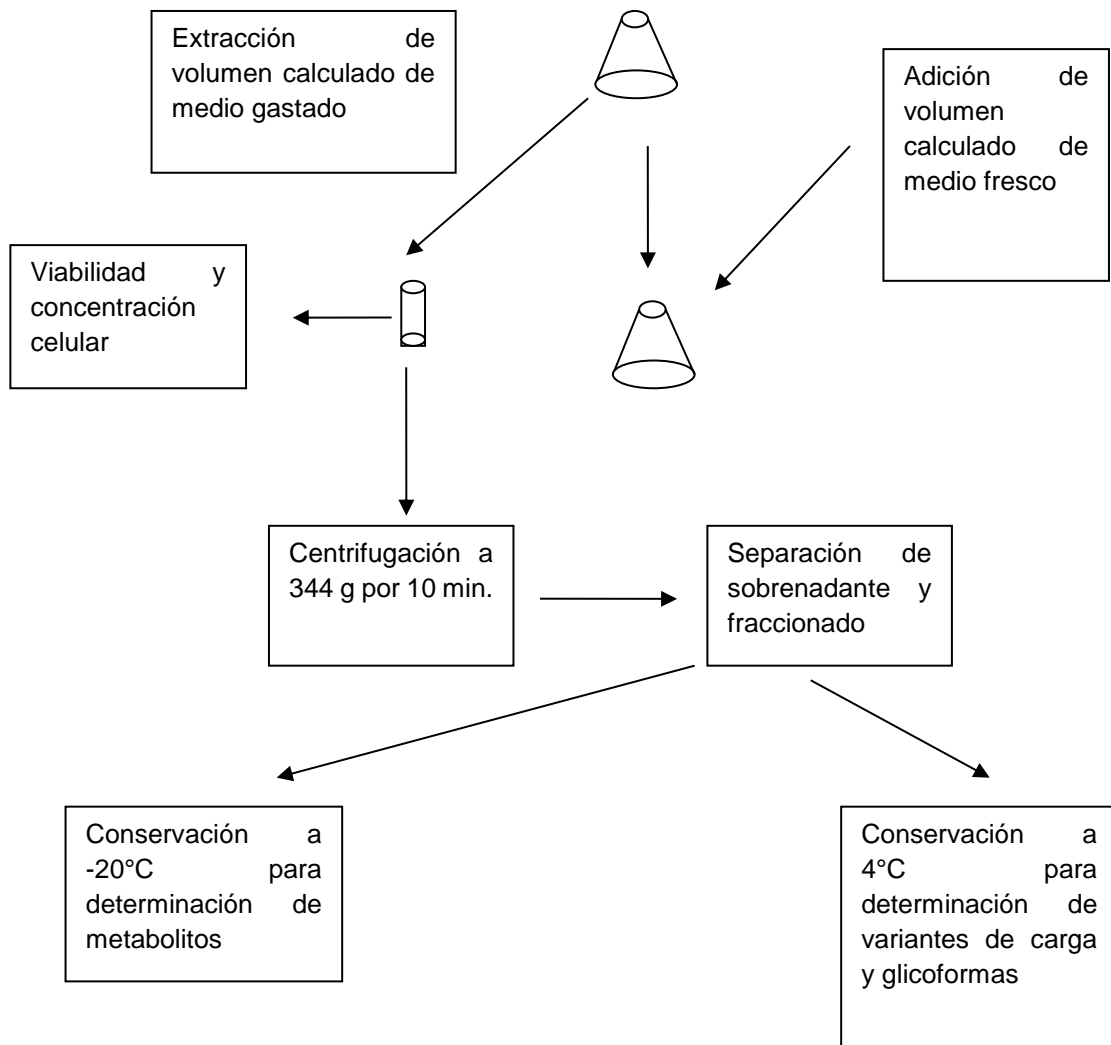


Figura 8. Esquema de operación del cultivo semicontinuo.

6.5 Cultivo continuo en biorreactor en modo de perfusión

Se estudiaron 2 cultivos independientes de perfusión en biorreactor con un volumen de 500 mL cada uno. Mediante la manipulación de las tasas de dilución, drenado y perfusión se controló la velocidad de crecimiento.

Se utilizó un biorreactor New Brunswick con una capacidad de 1 L. El cual estuvo instrumentado con controles de temperatura, agitación, oxígeno disuelto, pH, y de nivel controlados por un sistema New Brunswick BioFlo/CelliGen 115 el cual adicionalmente tuvo 3 bombas peristálticas. Se utilizó una bomba para la alimentación de medio de cultivo, otra para el control del pH mediante la adición de hidróxido de sodio y la tercera para la adición de antiespumante. Adicionalmente se

incluyó un medidor de concentración celular FUTURA PROBE, 12 x 320 mm, conectado de manera independiente a una computadora, con la ayuda del cual fue posible monitorear de manera aproximada la concentración celular durante el cultivo. También, se utilizó un condensador con recirculación de líquido a 15°C para evitar la evaporación del cultivo, así como un puerto de aireación superficial y otro de aireación sumergida.

Para poder operar el biorreactor en modo de perfusión continua se realizaron los siguientes ajustes:

1.- Acoplamiento del sistema de perfusión. En un puerto del reactor se instaló el sistema BioSep 1L/día (sistema de perfusión acústico). Este consistió en una sola pieza que fue montada sobre la tapa del reactor. En un extremo tenía un tubo de succión que se colocó dentro del cultivo y el otro extremo quedó en la parte externa del reactor. En la parte intermedia del sistema localizada fuera del reactor contaba con una cámara de separación en la cual se lleva a cabo la separación celular mediante ondas acústicas. Estas ondas acústicas inmovilizaban una alta proporción de células contenidas en el medio de cultivo generando aglomerados de estas. Por consiguiente, a la salida de la cámara, el medio de cultivo estaba casi libre de células. En el extremo localizado fuera del biorreactor se conectó mediante tubería de silicón a una bomba peristáltica Master Flex. Esta bomba trabaja en dos ciclos, uno de succión y uno de retorno, donde en la etapa de succión se realizaba la extracción de medio de cultivo libre de células y en la etapa de retroceso regresa las células aglomeradas inmovilizadas hacia el reactor.

2.- Acoplamiento de un sistema de drenado. Este punto de drenado consistió en la colocación de un puerto sobre la tapa del reactor introducido mediante tubería dentro del cultivo. En su parte exterior fue conectado a una bomba peristáltica Watson Marlow 101F. La función de este puerto fue la de extraer células junto con el cultivo. Esto con el objetivo de extraer las células en exceso originadas por el crecimiento celular y mantener constante la concentración celular en el cultivo.

3.- Sistema de alimentación. Puesto que se instalaron dos puntos de extracción de medio de cultivo, operando cada uno de ellos de manera independiente (perfusión/drenado). También, se instaló un sensor de nivel para mantener

constante el volumen del reactor, el cual fue controlado por el sistema New Brunswick BioFlo/CelliGen 115, alimentando medio de cultivo mediante una de sus 3 bombas peristálticas. El funcionamiento de esta bomba dependió de la demanda generada por la extracción en la perfusión y en el drenado.

4.- Muestreos, alimentación y cosecha. Las operaciones que requerían la apertura del sistema de perfusión se realizaron dentro de una campana de flujo laminar. Se realizó el cambio de reservorios de cosecha dos veces al día. Para lo cual, se prepararon alícuotas de entre 500 y 800 mL del medio de alimentación, según la demanda del reactor (cada 12 a 36 horas).

Tabla 2. Condiciones de operación del cultivo de perfusión.

Parámetro	Setpoint	Mecanismo de control
Oxígeno disuelto	30%	Oxígeno puro, aire.
pH	7.2	Adición de hidróxido de sodio
Temperatura	37°C	Suministro de CO ₂
Agitación	180 rpm	Chaqueta térmica
Concentración celular	15x10 ⁶ cel/mL	Drenado, alimentación

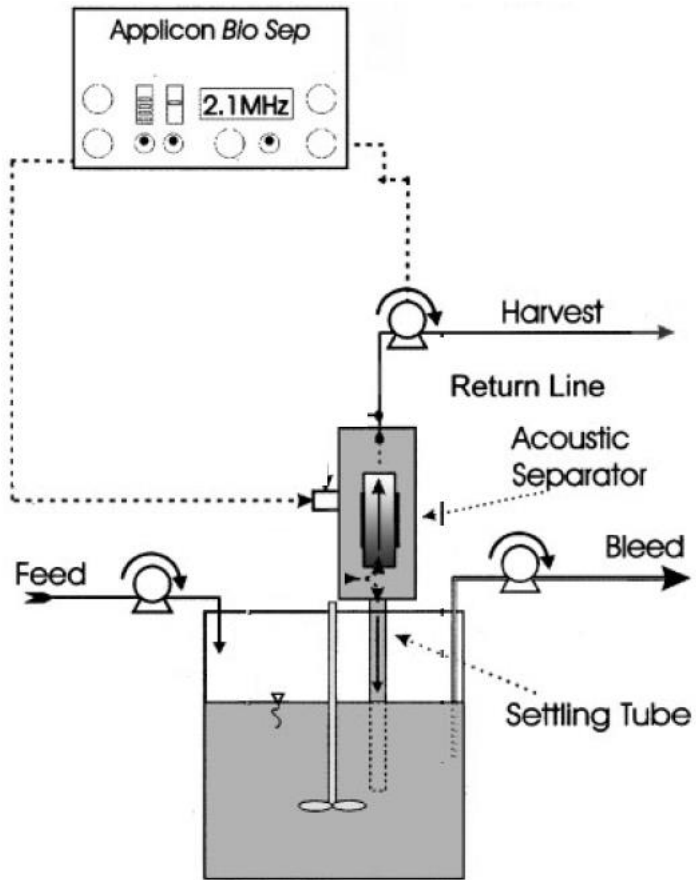


Figura 9. Esquema del sistema de perfusión, drenado y alimentación en el cultivo de perfusión.

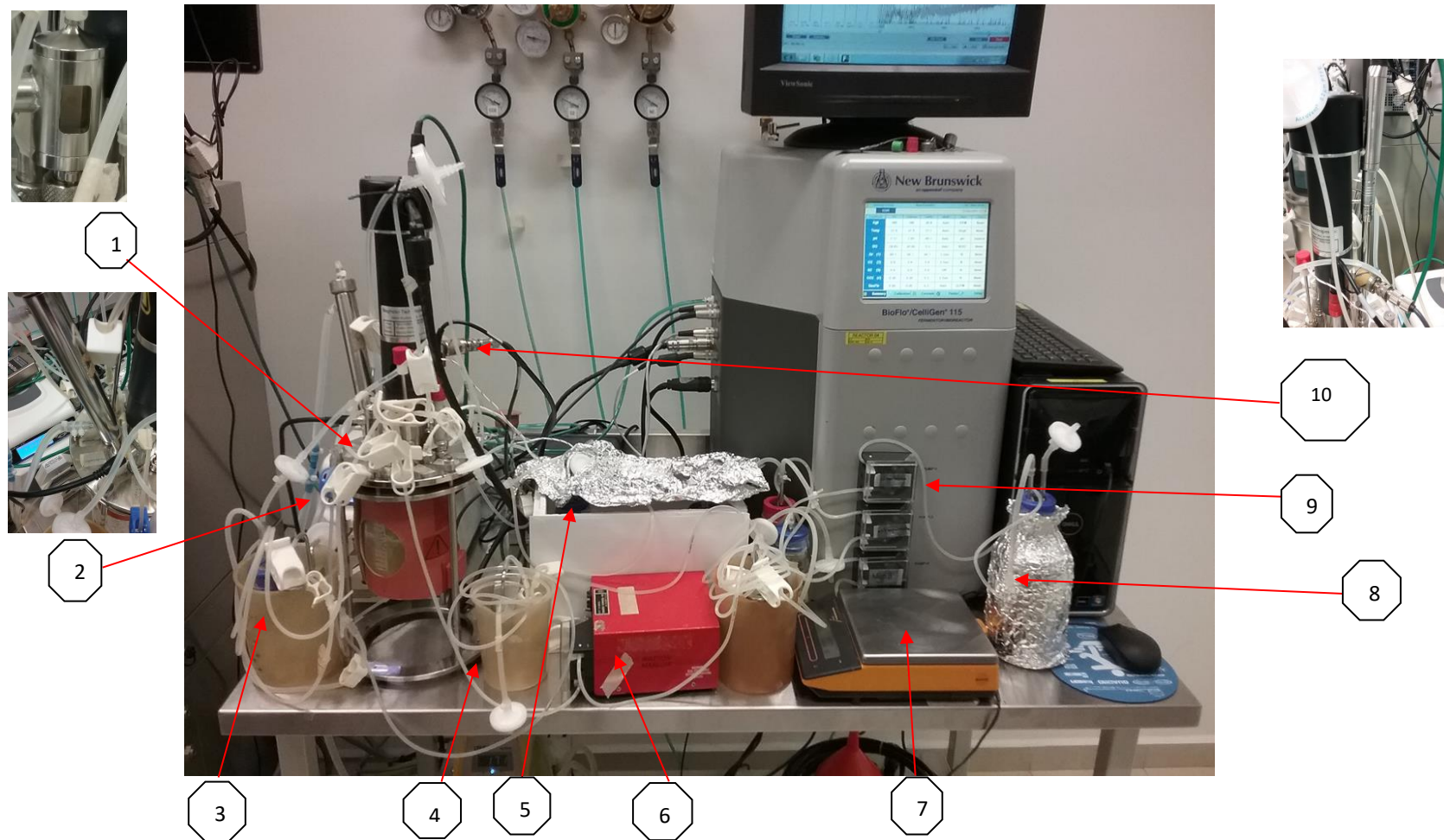


Figura 10. Sistema de cultivo continuo en modo de perfusión utilizado en este proyecto. Se resaltan algunos de los elementos que fueron necesarios para la realización de la operación de la perfusión. 1) Sistema de perfusión Biosep. 2) Bomba peristáltica Master Flex acoplada a la perfusión. 3) Muestreo del Biorreactor. 4) Muestreo del sistema de perfusión. 5) Cosecha (perfusión/drenado) en sistema aislado térmicamente. 6) Bomba peristáltica de drenado Watson Martlow. 7) Balanza granataria para monitoreo de flujos (perfusión/drenado/alimentación). 8) contenedor de medio de cultivo fresco. 9) Bomba peristáltica de alimentación. 10) Sensor de concentración celular Futura.

6.5.1 Recambio de medio de cultivo y toma de muestras

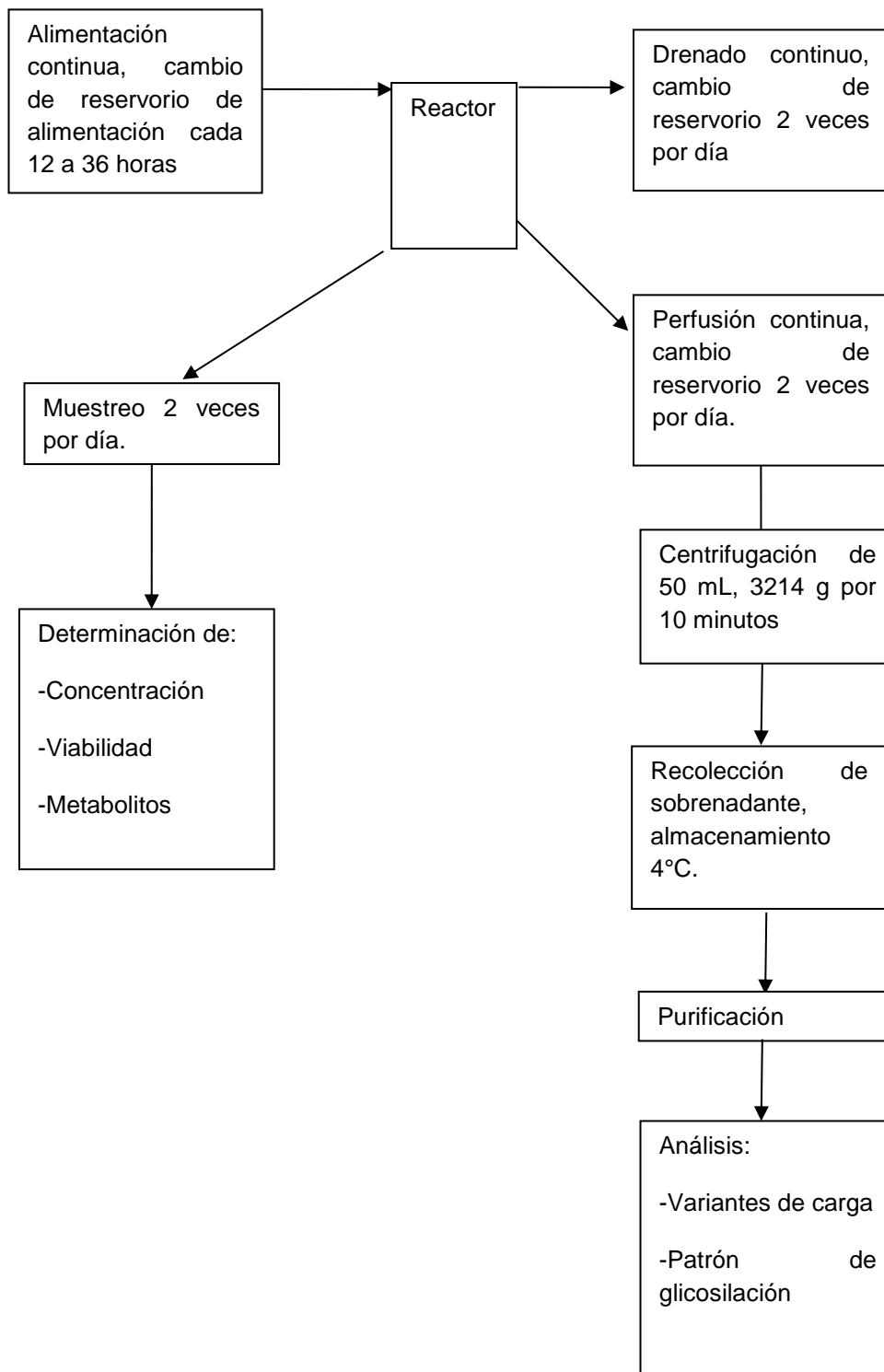


Figura 11. Esquema de la alimentación, muestreo y cosecha del cultivo continuo en modo de perfusión.

6.5.2 Cálculo de la alimentación de volumen de medio de cultivo por célula para obtener velocidades de crecimiento predefinidas en cultivos en perfusión

A partir de los cultivos semicontinuos realizados en matraz, se realizó un análisis de las concentraciones celulares que permitieron obtener las dos tasas de dilución estudiadas (0.1 d^{-1} y 0.5 d^{-1}) en el estado estable. A continuación, estos resultados se relacionaron con la velocidad de crecimiento obtenida (igual a la tasa de dilución) Para esto, se realizó una regresión lineal entre el consumo de medio de cultivo y la velocidad específica de crecimiento. Se obtuvo la ecuación 3, que fue utilizada para el cálculo de la tasa de dilución en los cultivos continuos de perfusión.

$$q_{medio} = 65(pL/cel)\mu_{obj} + 26.5(pL \cdot cel/día) \quad \text{Ec. 3}$$

Donde “ q_{medio} ” corresponde a la velocidad de consumo de medio de cultivo por célula, expresado en $nL/cel \cdot día$, y “ μ_{obj} ” corresponde a la velocidad específica de crecimiento objetivo expresada en d^{-1} .

Cálculo de la tasa de dilución para concentración celular y velocidad de crecimiento predefinidas

Una vez conocida la cantidad de medio requerida por célula, el siguiente paso fue la determinación de la tasa de dilución a implementar en el reactor.

$$D = \frac{1}{día} = \frac{x_{obj} \times 10^6 \text{ cel}}{mL} \left(\frac{1 \text{ mL}}{1 \times 10^9 pL} \right) \left(\frac{q_{medio} \frac{pL}{cel \cdot día}}{1} \right) \quad \text{Ec. 4}$$

Donde “ D ” es la tasa de dilución y “ x_{obj} ” corresponde a la concentración celular objetivo.

6.5.3 Balance de biomasa

Hasta este momento se determinó el flujo de alimentación. Sin embargo, para mantener el estado de equilibrio en el reactor (número de células constante, así como velocidad específica de crecimiento constante), fue necesario determinar que

flujo de salida llevaba células (flujo de drenado). Adicionalmente, se determinó el medio libre de células (flujo de perfusión) ya que el desequilibrio entre ambos ocasionaría el lavado del reactor o el incremento de la concentración celular.

Para poder determinar la proporción de retención celular en el estado de equilibrio fue necesario determinar el balance de masa en el reactor en cuanto a la velocidad de crecimiento y la extracción celular.

$$\text{Cambio neto de biomasa} = \text{crecimiento} - \text{salida} \quad \text{Ec. 5}$$

$$\frac{Vdx}{dt} = V\mu x - (1 - \alpha)Fx$$

Donde “V” es el volumen del reactor. “dx” es el diferencial de células. “μ” es la velocidad específica de crecimiento. “dt” es el diferencial del tiempo. “α” se relaciona con la perfusión que es equivalente a la fracción de retención celular. “F” es el flujo total de alimentación que es equivalente al flujo de salida (suma del flujo de perfusión y el flujo de drenado).

Reordenando la ecuación, se obtuvo en términos de la tasa de dilución

$$dx = \frac{V}{V}\mu x dt - (1 - \alpha)\frac{F}{V}x dt$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - (1 - \alpha)Dx$$

Considerando que se quiere trabajar el reactor en un estado de equilibrio donde no se tenga variación de la concentración celular con respecto al tiempo, “μ” en el estado de equilibrio será igual D(1-α).

$$\frac{dx}{dt} = 0 = \mu x - (1 - \alpha)Dx$$

$$0 = \mu x - (1 - \alpha)Dx$$

$$\mu = (1 - \alpha)D \quad \text{Ec. 6}$$

6.5.4 Determinación de la tasa de drenado y tasa de perfusión

Para este proyecto se definió, que la tasa de dilución es la suma de la tasa de drenado (D_s) y tasa de perfusión(D_p).

$$D = D_p + D_s$$

Para definir las tasas de perfusión y drenado para operar el reactor se debe considerar el valor μ objetivo y determinar el valor teórico de α a implementar en el sistema.

$$\alpha = 1 - \frac{\mu}{D} \quad \text{Ec. 7}$$

Una vez determinada α fue sustituida en la ecuación 8. Para la determinación de la tasa de perfusión D_p .

$$D_p = \frac{D\alpha}{\left[1 - \left(1 - \frac{\% \text{ retención}}{100}\right)\right]} \quad \text{Ec.8}$$

Donde % de retención es la eficiencia del sistema de perfusión y es determinado mediante la ecuación 11.

Una vez determinada la tasa de perfusión se continuó con el cálculo de la tasa de drenado con la ecuación 9.

$$D_d = D - D_p \quad \text{Ec. 9}$$

Conversión de tasas de dilución a flujos

Una vez obtenidas las tasas de operación (dilución, drenado, perfusión) se determinó su equivalente en flujo.

$$\text{Flujo} = \frac{mL}{min} = (D)V_B = \frac{1}{día} (x \text{ mL en reactor}) \frac{1 \text{ día}}{1440 \text{ min}} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde V_B es el volumen del biorreactor expresado en mL. Se aplica un factor para convertir días a minutos, quedando el flujo en $mL \cdot min^{-1}$. Se aplicó esta misma

ecuación para la determinación de flujos, tanto de perfusión como de drenado a partir de sus respectivas tasas de dilución, D_p y D_d .

6.5.5 Calculo de la eficiencia de perfusión en proceso

La evaluación de la eficiencia de perfusión se realizó mediante un punto de muestreo ubicado posterior a la salida de la cámara de perfusión y antes de la llegada al reservorio de cosecha. A partir del muestreo de este punto se realizó conteo celular mediante cámara de Neubauer y se correlacionó con la concentración celular en el reactor mediante la ecuación 11.

$$\% \text{ retención} = 100 \left(1 - \frac{\text{concentración celular en perfusion}}{\text{concentración celular en reactor}} \right) \quad \text{Ec. 11}$$

6.5.6 Determinación de alfa en proceso (fracción de retención celular)

Como se mencionó previamente, α representa la fracción de células retenidas con respecto al flujo total de extracción de medio de cultivo. Si se tuviera una eficiencia de retención del 100% en la perfusión, alfa representaría la fracción de perfusión con respecto al flujo total de salida (perfusión más drenado). Sin embargo, la eficiencia de la perfusión puede ser variable, pudiendo ser de cero en caso de falla o modo apagado de la cámara de perfusión Incluso, pudiera tener valores cercanos al 100% si el equipo está trabajando en condiciones óptimas. En las condiciones de trabajo típicas, nunca será del 100%. El valor de alfa fue determinado con la ecuación 12.

$$\alpha = \frac{D_p}{D} \left[1 - \left(1 - \frac{\% \text{ retención}}{100} \right) \right] \quad \text{Ec. 12}$$

6.5.7 Determinación de la concentración celular a partir de capacitancia del sensor de biomasa

Durante el cultivo se determinó la concentración celular mediante conteo celular en cámara de Neubauer. Además, el reactor estaba equipado con un sensor de capacitancia, parámetro que está correlacionado con la concentración celular en el reactor. Al final del cultivo, se construyó una curva de calibración de concentración celular determinada en la cámara de Neubauer contra la capacitancia registrada en los puntos de muestreo. Se ajustaron los datos a distintas ecuaciones, encontrando que la ecuación que mejor explica la relación de capacitancia “y” y la concentración fue una ecuación polinómica grado 4 (Ec. 13). Esta ecuación fue utilizada de manera retrospectiva para determinar la concentración celular en cualquier punto del cultivo.

$$x = ay^4 + by^3 + cy^2 + dy + e \quad \text{Ec. 13}$$

Se utilizó este dato de concentración celular para el cálculo de las velocidades específicas de crecimiento durante el cultivo.

Donde “y” corresponde a la lectura de capacitancia (pF/cm) obtenida por el sensor de concentración celular.

6.6 Determinación de parámetros cinéticos

6.6.1 Determinación de μ_{\max} en cultivo tipo lote

Para la determinación de la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial se utilizó la ecuación 14. La cual es la forma linealizada del modelo exponencial de crecimiento. Donde, x es la concentración celular en un tiempo determinado. x_0 es la concentración celular inicial. μ es la velocidad específica de crecimiento, que para que sea válida la ecuación debe ser constante (crecimiento exponencial). Finalmente, t_0 es el tiempo inicial.

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu(t - t_0) \quad \text{Ec. 14}$$

Esta ecuación puede ser graficada. Donde $\ln(x/x_0)$ corresponde a las ordenadas ("y"), $(t-t_0)$ corresponde a las abscisas ("x") y μ a la pendiente. Los datos obtenidos en la fase exponencial del cultivo tipo lote fueron graficados siguiendo esta regresión para el cálculo de μ_{\max} .

6.6.2 Ajuste del modelo de crecimiento en cultivo tipo lote

Para el modelado de la cinética de crecimiento en la fase exponencial, se utilizó la ecuación 15, la cual se obtiene al despejar x de la ecuación 14.

$$x = x_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad \text{Ec. 15}$$

El modelado permitió simular de una manera más precisa cómo se daría el crecimiento hora a hora en la fase exponencial en un cultivo. Una vez determinados los valores de concentración celular con el modelo, estos fueron comparados con los valores reales obtenidos en el cultivo lote, mediante la utilización de la función coeficiente.r2.

6.6.3 Calculo de la velocidad específica de crecimiento en cultivo semicontinuo

$$\mu = \frac{\ln \frac{x}{x_0}}{(t - t_0)} \quad \text{Ec. 16}$$

x corresponde a la concentración en el tiempo de recambio del medio de cultivo t . x_0 corresponde a la concentración celular Inicial (concentración después del recambio previo t_0). Donde, x_0 es calculada de acuerdo con la ecuación 22.

6.6.4 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento en perfusión

En la ecuación 6 se demostró que en el estado estable μ es igual a $(1-\alpha)D$. Para determinar μ en cualquier momento se integró la ecuación que se obtuvo del balance de masa en el apartado 6.5.3.

$$\mu = \left[\ln \left(\frac{x}{x_0} \right) \frac{1}{(t - t_0)} \right] + (1 - \alpha)D \quad \text{Ec. 17}$$

Donde “x” es la concentración celular en un tiempo 2 y “x₀” es la concentración en “t₀”, “t” y “t₀” representan sus respectivos tiempos en los puntos de cálculo. Es de observar que si la concentración inicial y final fueran iguales en ambos tiempos de monitoreo se eliminaría el primer término de la ecuación, con lo que se tendría que “ μ ” es igual a $D(1-\alpha)$. Sin embargo, ligeras variaciones en las bombas que controlan la perfusión, el drenado y la alimentación, así como variaciones en el porcentaje de retención por el sistema de perfusión, pueden ocasionar que el equilibrio perfecto no se alcance.

6.6.5 Cálculo del área bajo la curva

Para la determinación del área bajo la curva, se utilizó la ecuación 18 basada en el método de los trapecios. y_n hace referencia a la concentración celular en un tiempo determinado. y_{n-1} es la concentración celular en un tiempo previo. x_{n-1} es el tiempo correspondiente a la concentración celular en y_{n-1} . x_n es el tiempo en y_n .

$$ABC = \frac{y_1 + y_2}{2}(x_2 - x_1) + \frac{y_2 + y_3}{2}(x_3 - x_2) + \frac{y_{n-1} + y_n}{2}(x_n - x_{n-1}) \quad \text{Ec. 18}$$

6.6.6 Cálculo de velocidades de consumo de nutrientes o generación de metabolitos secundarios

Para la determinación de la velocidad de consumo de nutrientes o generación de metabolitos en cultivo semicontinuo y tipo lote se utilizó la ecuación 19.

$$q = \frac{(C_f - C_i)}{ABC} \quad \text{Ec. 19}$$

C_f corresponde a la concentración final (o en cultivo semicontinuo a la concentración previa al siguiente recambio). C_i corresponde a la concentración del nutriente inicial (o en cultivo semicontinuo corresponde a la concentración posterior al recambio previo). ABC corresponde al área bajo la curva en el intervalo en estudio en unidades de cel/volumen·tiempo.

Para la determinación de la velocidad de consumo de nutrientes o generación de metabolitos en cultivo continuo de perfusión se utilizó la ecuación 20.

$$q = D \frac{(C - C_i)}{CCP} \quad \text{Ec. 20}$$

C es la concentración del nutriente a la salida del reactor. C_i es la concentración del nutriente del medio alimentado. CCP es la concentración celular promedio.

6.6.7 Cálculo de velocidad de consumo de medio de cultivo en cultivo semicontinuo

$$q_{medio} = \frac{MCR}{ABC(V_B)} \quad \text{Ec. 21}$$

Donde, “ q_{medio} ” representa la velocidad de consumo de medio de cultivo por célula. “MCR” corresponde al volumen de medio de cultivo recambiado. ABC corresponde

al área bajo la curva en unidades de célula/volumen·tiempo. V_B es el volumen del matraz.

6.6.8 Cálculo de la concentración celular o de nutrientes después de un recambio en cultivo semicontinuo

$$C = C_f - C_f D(\Delta t) + C_e D(\Delta t) \quad \text{Ec. 22}$$

Donde C es la concentración después de un recambio. C_f es la concentración determinada antes del recambio. D es la tasa de dilución expresada en h^{-1} . Δt es el tiempo que fue considerado para el recambio. El producto de $D(\Delta t)$ corresponde a la fracción de reactor a recambiar en la alimentación en un momento determinado. En el caso de la concentración de entrada (C_e) de amonio, lactato y concentración celular corresponden a cero. Puesto que, no hay ingreso de ninguno de estos componentes al reactor sino únicamente extracción. (Nota: para concentración celular se sustituye C por x).

6.7 Calculo del rendimiento de metabolitos

$$Y_{\frac{x}{z}} = \frac{q_x}{q_z} \quad \text{Ec. 23}$$

Donde x es el metabolito secundario para el que se desea conocer el rendimiento. z es el nutriente con respecto al cual se está determinando el rendimiento. q es la velocidad de consumo de nutrientes o generación de metabolitos de interés. El rendimiento Y tiene unidades de mol del metabolito secundario sobre mol de concentración del nutriente.

6.8 Determinación del estado estable

El estado estable para los cultivos en perfusión o pseudo-estable para los cultivos en matraz se definió como el periodo en el tiempo donde se redujo la variabilidad de la velocidad específica de crecimiento, las concentraciones celulares y de

metabolitos. Se consideraron todos los metabolitos determinados para los cultivos: glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio. Estos criterios fueron definidos a partir de lo reportado en la literatura. Donde, han definido a la fase estable como la etapa del cultivo donde los parámetros ambientales del cultivo se mantienen constantes con respecto al tiempo (Hayter et al., 1993). El cual ha sido identificado al encontrar dos mediciones sin cambio (Vergara et al., 2014) o después de pasar 3 tiempos de residencia (Europa et al., 2000).

6.9 Purificación de muestras mediante proteína A

Las muestras almacenadas a 4°C fueron neutralizadas a pH de 7.75 con una solución tris-base 1M pH 9.0, 2.0 M de NaCl. Posteriormente fueron centrifugadas a 3214 g durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada de ángulo fijo recuperándose el sobrenadante. Este fue filtrado por una membrana con tamaño de poro de 0.45 µm de PVDF. Posteriormente, fueron purificadas en un equipo ÄKTAPrime Plus utilizando una columna empacada con 2.5 cm³ de resina de afinidad de proteína A.

La columna fue inicialmente equilibrada con una solución de PBS pH 7.6 con 0.3 M de NaCl, con la posterior carga de la muestra a purificar. Luego, se lavó con 5 volúmenes de solución de equilibrio. Finalmente se realizó la elución de la proteína de interés con una solución de glicina 0.1 M pH 3.0.

6.10 Diafiltración y concentración de muestras

Para el cambio de buffer y concentración de la muestra, se utilizaron centricones Spin-X UF concentrator con capacidades de 6 y 0.5 mL con un corte molecular de 10 kDa.

El centricon con capacidad de 6 mL se utilizó para concentrar aquellas muestras que se deseaba tuvieran un volumen final mayor a 0.5 mL. Se centrifugó en una centrifuga refrigerada a 9500 g a una temperatura de 4°C. Inicialmente, se concentró la muestra sin permitir que se redujera el volumen a menos de 1 mL, con la

consiguiente adición de 4 mL del siguiente vehículo y centrifugando hasta obtener nuevamente 1 mL. Este proceso se repitió hasta completar 3 ciclos. Finalmente, se centrifugó hasta llegar al volumen deseado, entre 0.5 y 1.0 mL.

El centrífugo con capacidad de 0.5 mL se utilizó para concentrar aquellas muestras para las que se deseaba un volumen final entre 0.1 y 0.2 mL. Se centrifugó en una centrifuga refrigerada a 14,500 g a una temperatura de 4°C hasta un volumen de 0.2 mL. Se continuó con la adición de 0.5 mL del siguiente vehículo y se centrifugó hasta obtener nuevamente 0.2 mL. Este proceso se repitió hasta completar 3 ciclos. Finalmente se centrifugo hasta llegar al volumen deseado entre 0.1 y 0.2 mL.

6.11 Análisis de nutrientes y metabolitos

Las muestras de cultivos recolectadas, centrifugadas y almacenadas a -20°C, fueron descongeladas para la determinación de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio en un analizador bioquímico YSI 2950. Se utilizó un buffer de equilibrio de fosfatos para la operación del módulo analizador de glutamina, glutamato, glucosa y lactato. Para la operación del módulo analizador de amonio se utilizó un buffer de acetato de litio. Para la calibración de los módulos se utilizaron las siguientes soluciones: glucosa/lactato 2.5/0.5 g/L, respectivamente, glutamato 5 mM, glutamina 5 mM, y amonio 500 mg/L. Las cuales fueron preparadas a partir de D-glucosa, L-lactato cálcico hidratado, L-ácido glutámico monosódico monohidratado, L-glutamina y cloruro de amonio.

6.12 Cuantificación de IgG

Se utilizó un equipo NanoDrop a una longitud de onda de 280 nm para la determinación del contenido de proteínas de la muestra. Para la determinación, se cargó un volumen de 2 µL en el equipo, utilizándose como blanco el respectivo buffer en el que se encontraba la muestra.

6.13 Electroforesis en gel

Se tomó una alícuota de muestra purificada, equivalente a 5-10 μg de proteína, en un volumen final de 15 μL .

-Para la realización de los geles en condiciones nativas, se agregó a la muestra 5 μL de buffer de carga 4x. El buffer contiene 8% de SDS, 0.04% de azul de bromofenol y 40% de glicerol, mezclando con micropipeta.

-Para la realización de los geles en condiciones reductoras se agregó a la muestra 5 μL de buffer de carga 4x. El buffer contiene 8% de SDS, 0.04% de azul de bromofenol, 40% de glicerol, 1% de 2-mercaptoetanol, 200 mM Tris-HCl pH 6.8, se mezcló con micropipeta y se incubó por 10 minutos a 99°C.

Finalmente, se colocaron 20 μL de la preparación y se cargó en el gel utilizando como referencia 3 μL de marcador de peso molecular. Se realizó la separación a 110 V, hasta observar que el colorante de carga llegó al extremo del gel.

Se apagó la fuente de poder y se transfirió el gel a un recipiente. Se teñió con solución de 0.06% de brilliant blue R-250, 10% de ácido acético y 30% de metanol, cubriendo con esta solución el gel e incubando a temperatura ambiente durante 1 hora en agitador orbital a 40 rpm. Posteriormente, se destiñó mediante la remoción de la solución de tinte y adición de solución de ácido acético al 10%, continuando la incubación en agitación hasta que se destiñó el gel y se observaron las bandas con claridad. Se removió la solución de tinte y se agregó agua grado Milli Q. Finalmente, se tomó una fotografía mediante el uso de ChemiDoc (Bio-RAD).

6.14 Determinación del perfil de variantes de carga

Muestras del AcM purificado fueron diafiltradas, o en caso de estar concentradas, fueron diluidas en un buffer 20 mM MES (ácido 2-morfolino etano sulfónico), 30 mM NaCl pH 5.6, hasta una concentración final de anticuerpo entre 1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las muestras se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico. Se utilizó un cromatógrafo Alliance Bio e2796 acoplado a un detector de arreglo de diodos Waters 2998. Se utilizó una columna Dionex ProPac WCX-10, 4.0 mm ID x 250 mm

a una temperatura de 30°C. La separación se realizó mediante la utilización de una fase móvil con gradiente (iniciando con 80% de A y 20 % de B y terminando con 50% de A y 50% de B) con un flujo de 1mL/min. El buffer A corresponde al descrito como buffer de la muestra y el buffer B corresponde a su equivalente, pero con 240 mM de NaCl.

Una vez obtenidos los cromatogramas de las muestras, se definió como fracción principal al pico central y de mayor altura. Los picos obtenidos en tiempos de retención previos se definieron como variantes de carga ácidas y los obtenidos posteriormente como variantes de carga básicas. Se integró el área bajo la curva de las tres variantes como se muestra en la Figura 16 (sección 7.6). Se determinó la abundancia relativa de cada fracción con respecto al área total.

6.15 Determinación del perfil de N-glicosilación por HPLC

Se utilizaron muestras purificadas mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Las muestras fueron diafiltradas con agua Milli-Q para la eliminación de sales. Se tomó una alícuota correspondiente a 100 µg de proteína (se puede analizar un mínimo de 30 µg en caso de no tener muestra suficiente). Se secaron las muestras en un concentrador Savant Speed Vac Plus SC110A y se redisolviaron con 32.5 µL de agua Milli-Q. Se agregaron 2.5 µL de 2% SDS, β-mercaptoetanol 1M para la desnaturalización de la proteína. Una vez desnaturalizada la proteína, se agregaron 5 µL de IGEPAL 630 al 7% para detener la acción de los agentes desnaturalizantes y garantizar la actividad de la enzima PNGasa F. Se agregaron 5 µL de Buffer 10X para PNGasa, 4 µL de agua Milli-Q y 1 µL de PNGasa F de *Elizabethkingia meningosepticum* del proveedor Merck Millipore Cat. 362185. Donde la función de la PNGasa F es cortar el enlace N-glicosídico entre la asparagina y la N-acetilglucosamina. Se incubó la muestra por 15 horas a 37°C. Posteriormente se agregó un estándar interno de maltosa 10 mM, agregando 1 µL de estándar por cada 10 µg de proteína en procesamiento. Para separar los glicanos en solución de la proteína, se pasó la muestra a través de sistemas de concentración Spin-X UF

concentrador con corte molecular de 30 kDa con capacidad de 0.5 mL. Se centrifugó a 8613 g. Se recolectó el filtrado y se secó en concentrador Savant Speed Vac. Posteriormente, se agregaron 4 μ L de colorante 2-aminobenzamida (2-AB). Se incubó en termobloque durante 2 horas a 75°C para realizar una aminación reductiva con el glicano y formar un complejo glicano-colorante que pueda ser detectado con un detector de fluorescencia. Una vez completado el tiempo de incubación, se congeló la muestra a -15°C y se mantuvo en estas condiciones durante 15 minutos. Posteriormente se retiró el colorante 2-AB sin reaccionar de la muestra, para lo cual se colocaron 2 membranas de celulosa (papel Whatman No. 1) en una columna. Se pasó a la columna 1 mL de agua Milli-Q, 5 mL de ácido acético al 30% y 1 mL de acetonitrilo. Una vez completado este tratamiento, se colocó la muestra sobre la membrana de celulosa. Se enjuagó el vial contenedor con 15 μ L de acetonitrilo y se adicionó también el enjuague sobre la membrana. Se dejó en reposo durante 15 minutos. Nuevamente se lavó el vial de la muestra con 100 μ L de acetonitrilo colocándose también sobre la membrana. Enseguida se agregó 1 mL de acetonitrilo y consecutivamente se adicionaron 5 mL de acetonitrilo 96%. Hasta este momento, todo el líquido tratado fue desechado. El siguiente paso consistió en eluir el complejo glicano-colorante mediante la adición de 4 alícuotas de 0.5 mL de agua. Estas alícuotas fueron recolectadas y congeladas con su posterior secado en concentrador Savant Speed Vac. Los glicanos secos fueron resuspendidos mediante la adición de agua Milli-Q necesaria para tener una concentración final de 1 μ g/ μ L respecto a la proteína inicial procesada. Se identificó esta solución como complejo glicano-colorante purificado. Se tomaron para el análisis cromatográfico 10 μ L de esta solución y se adicionaron 40 μ L de acetonitrilo. Esta última mezcla fue la inyectada en el cromatógrafo. Adicionalmente, se inyectó una escalera de glucosa del proveedor Sigma-Aldrich Cat. D3818 la cual fue previamente derivatizada con colorante 2-AB. Esta escalera consiste en una mezcla de polímeros con unidades variables de glucosa que van desde 1 unidad hasta aproximadamente 20 unidades de glucosa. Se ha reportado una correlación del tiempo de retención de diferentes glicanos encontrados en glicoproteínas con el tiempo de retención de la escalera de glucosa (Guile et al., 1996).

Para el análisis se utilizó cromatografía de fase normal en un cromatógrafo Alliance Bio e2796 acoplado a un detector de fluorescencia Waters 2475. Se utilizó una columna TSKgel Amido-80, 5µm 80A sílica, 4.6 mm ID x 250 mm a una temperatura de 30°C. Se realizó la separación mediante la utilización de una fase móvil con gradiente. El gradiente inició con 80% de A y 20 % de B y terminó con 47 % de A y 53% de B. Donde, A es acetonitrilo y B es un Buffer de formato de amonio 250 mM pH 4.4. Mediante esta separación cromatográfica se separaron los glicanos de diferente tamaño (Hernández et al., 2015 y Lipscomb et al., 2005). Una vez obtenido el cromatograma de la escalera de glucosa se registraron los tiempos de retención de las diferentes unidades de glucosa y se realizó una regresión. La regresión se ajustó a una regresión polinomial de tercer orden, (ecuación 24). Mediante esta ecuación fue posible transformar el tiempo de retención de los glicanos problema analizados en unidades de glucosa. Previa a la realización de este proyecto, nuestro grupo caracterizó el perfil de glicosilación del AcM en estudio a partir de proteína obtenida por cultivo lote alimentado. Asimismo, propusieron estructuras comunes de glicanos encontrados en IgG1. Esto lo realizaron al correlacionar las unidades de glucosa obtenidas con datos reportados en la literatura. Utilizaron datos como lo son los reportados por Guile y colaboradores (1996), así como Serrato y colaboradores (2004), que correlacionan unidades de glucosa con estructuras de glicanos.

En este proyecto se correlacionaron las unidades de glucosa de las muestras analizadas, con estructuras de glicanos previamente propuestas en nuestro grupo para este anticuerpo.

$$y = ax^3 + bx^2 + cx + d \quad \text{Ec. 24}$$

Donde “x” corresponde al tiempo de retención en el cromatograma y “y” corresponde a su equivalente en unidades de glucosa.

Adicionalmente, algunas muestras presentaron picos que no habían sido previamente identificados. Por lo que, se seleccionaron muestras representativas y fueron tratadas con α-manosidasa, que elimina manosas terminales, y con β-

hexosaminidasa que elimina N-acetilglucosamina terminal de glicanos complejos o híbridos. Con esto, fue posible discriminar picos que no correspondían a glicanos.

6.16 Viabilidad celular

La viabilidad fue determinada en el cultivo, muestreándose al menos 100 μL de cultivo. El medio de cultivo fue diluido con azul de tripano al 0.08% en PBS. Se realizaron las diluciones necesarias para llegar a una concentración de 100 a 500 células en 10 campos de una cámara de Neubauer. Para realizar la dilución, se utilizaron al menos 10 μL de cultivo y no más de 90 μL de azul de tripano por dilución. Para el conteo de las células se agregó la muestra diluida con azul de tripano en ambos lados de la cámara de Neubauer. Se realizó el conteo en los cuadrantes superior derecho e izquierdo así como en los cuadrantes inferior izquierdo y derecho y cuadrante central, esto para ambos lados de la cámara sumando 10 cuadrantes. Las células viables se observan sin coloración y las no viables color azul. El número de células fue determinado mediante la ecuación 25 y el porcentaje de viabilidad celular con la ecuación 26.

$$\text{Cel. viables (o no viables)} \quad \text{Ec. 25}$$

$$= \frac{\text{Células contadas}}{\text{No. cuadrantes contados}} * 10,000 * FD$$

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Células viables contadas}}{\text{Cel. totales}} 100 \% \quad \text{Ec. 26}$$

Donde FD hace referencia al factor de dilución.

6.17 Determinación de la productividad y rendimiento para cultivo continuo o semicontinuo

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad AcM purificado (mg)}}{\text{Volumen de cultivo purificado (L)}} \quad \text{Ec. 27}$$

$$Productividad\ específica = Rendimiento\left(\frac{mg}{L}\right)D\left(\frac{1}{día}\right)\frac{1x10^9\left(\frac{pg}{mg}\right)}{Concentración\ celular\ promedio\left(\frac{cel}{L}\right)} \quad Ec. 28$$

“D” es la tasa de dilución pudiendo ser expresada en d⁻¹, 1x10⁹ es un factor para convertir miligramos a picogramos, y la concentración celular es expresada en las mismas unidades de volumen que el rendimiento.

6.18 Análisis estadístico

Para determinar si existía efecto de la velocidad de crecimiento sobre el perfil de glicosilación y de variantes de carga se recurrió a la prueba t de Student con un alfa del 0.05.

Se determinó que existía efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre los distintos parámetros analizados del AcM, si la interpretación de la prueba t de Student era que las medias poblacionales eran diferentes. Posteriormente se revisó la tendencia de las medias para determinar si el efecto era positivo o negativo.

Se realizó simultáneamente un análisis de varianzas mediante la prueba F de Fisher.

Para dichos análisis se recurrió al Software STATGRAPHICS Centurion XV Versión 15.2.06, donde se validó que el análisis se estaba llevando de acuerdo a las siguientes ecuaciones y razonamientos.

Calculo de varianza combinada

Para realizar la prueba t de Student es necesario determinar la varianza combinada de ambos muestreos. Esto se realiza mediante la siguiente ecuación que es útil para tamaños muestrales balanceados y no balanceados (siendo los no balanceados aquellos que tienen diferente número de réplicas) (Montgomery y Runger, 2003).

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad Ec. 29$$

Donde S^2_1 y S^2_2 corresponden a la varianza de cada muestra, n_1 y n_2 al número de réplicas en cada población y S^2_p es la varianza combinada.

Prueba t de Student (igualdad de medias)

Donde la hipótesis nula es que las medias poblacionales son iguales.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

En la ecuación 30 se muestra el método para el cálculo de t_0 , la cual es comparada con tablas (Montgomery y Runger, 2003).

$$t_0 = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ec. 30}$$

Si $t_0 > t_{\frac{\alpha}{2}, n_1+n_2-2}$ se rechaza la hipótesis nula, las medias son diferentes.

Si $t_0 < t_{\frac{\alpha}{2}, n_1+n_2-2}$ se acepta la hipótesis nula, las medias son iguales.

Prueba F de Fisher (igualdad de varianzas)

Donde la hipótesis nula es que las varianzas poblacionales son iguales.

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

En la ecuación 31 se muestra el método para el cálculo de F_0 la cual es comparada con tablas (Montgomery y Runger 2003).

$$F_0 = \frac{S^2_1}{S^2_2} \quad \text{Ec. 31}$$

Si $F_0 > f_{\frac{\alpha}{2}, n_1-1, n_2-1}$ se rechaza la hipótesis nula, las muestras tienen varianza poblacional diferente.

Si $F_0 < f_{\frac{\alpha}{2}, n_1-1, n_2-1}$ se acepta la hipótesis nula, las muestras tienen la misma varianza poblacional.

Donde n_1 corresponde al número de réplicas de la muestra del denominador. n_2 es el número de réplicas de la muestra del denominador. n_1-1 corresponde a los grados de libertad de la muestra del numerador. n_2-1 corresponde a los grados de libertad de la muestra del denominador.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación del estado estable de los cultivos, para la evaluación del AcM y metabolismo

En primera instancia se realizó un cultivo tipo lote por duplicado para determinar la velocidad máxima de crecimiento en la fase exponencial (Figura A1). Se obtuvo una μ_{\max} de $0.0403 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$, valor que se fijó como referencia del 100% μ_{\max} .

En la Figura 12 a) y 12 b) se muestra la velocidad de crecimiento y tasa de dilución empleada para los dos cultivos de perfusión estudiados. Para el cultivo de la Figura 12 a) se obtuvo una velocidad específica de crecimiento en la fase estable de $52.8 \pm 5.3 \% \mu_{\max}$. En el resto del documento se hace referencia a este cultivo como perfusión 50% μ_{\max} . Para el cultivo de la Figura 12 b) se obtuvo una velocidad específica de crecimiento en la fase estable de $19.1 \pm 2.0 \% \mu_{\max}$. En el resto del documento se hace referencia a este cultivo como perfusión 20% μ_{\max} . Los cultivos de perfusión fueron iniciados en modo lote con una etapa de alta velocidad de crecimiento celular (12 a) y 12 b) línea azul) y un exceso de nutrientes (Figura A11, A13). Se inició el esquema de perfusión al segundo día en ambos cultivos (12 a) y 12 b) línea roja). Se incrementó la tasa de dilución de manera gradual dependiendo de la concentración celular y velocidad de crecimiento objetivo. Una vez que se alcanzó la concentración celular objetivo de $15 \times 10^6 \text{ cel/mL}$, se inició el esquema de drenado (extracción de medio de cultivo con células). Para llegar al estado estable, se balancearon las tasas de perfusión y de drenado. La línea horizontal negra indica los periodos en los que se alcanzó el estado estable, iniciando a los 8 y 14 días para los cultivos 50% y 20% de μ_{\max} respectivamente.

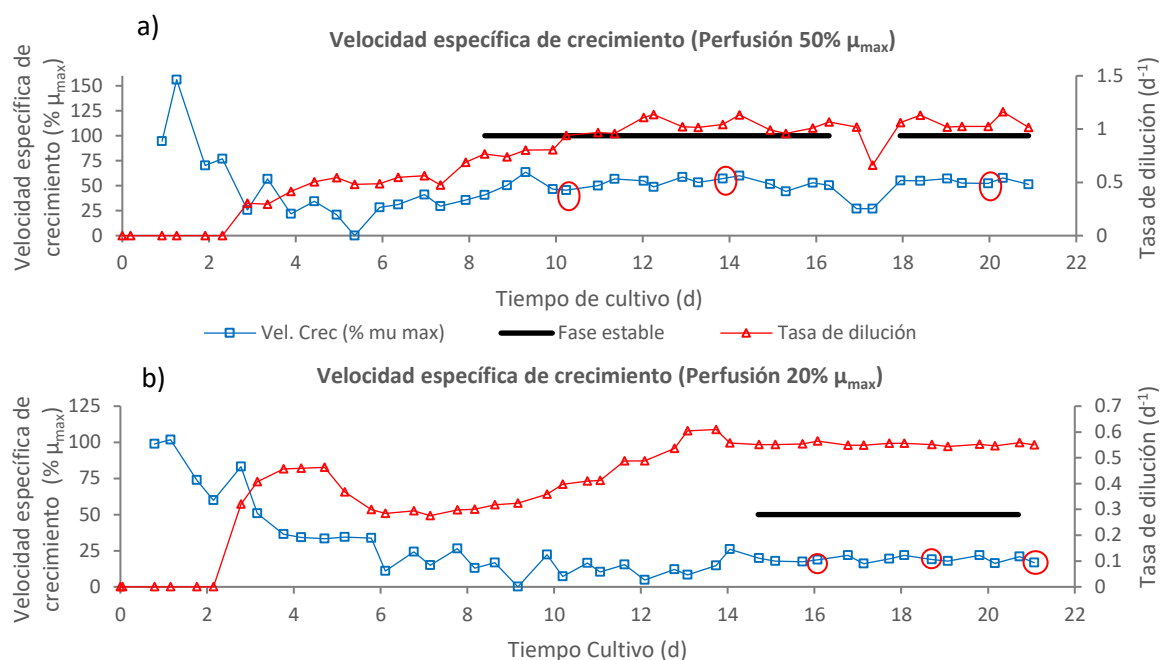


Figura 12. Periodos del estado estable en cultivos en perfusión. a) 50% de μ_{max} . b) 20% de μ_{max} . Se muestra en línea sólida horizontal negra los periodos considerados como estado estable. La línea azul representa las velocidades específicas de crecimiento durante el cultivo. La línea roja representa la tasa de dilución utilizada. Con óvalos rojos se indican los puntos de muestreo donde se determinó la productividad, rendimiento y el perfil de glicosilación y de variantes de carga del anticuerpo.

En la Figura 13 a) y b) se muestra la velocidad de crecimiento para los cultivos semicontinuos operados a la tasa de dilución de $0.1 d^{-1}$. Estos cultivos tuvieron una velocidad específica de crecimiento en la fase pseudo-estable de $10.4 \pm 44.8 \% \mu_{max}$. En el resto del documento se hace referencia a estos cultivos como matraz 10% μ_{max} . En la Figura 13 c) y d) se muestra la velocidad de crecimiento para los cultivos semicontinuos operados a la tasa de dilución de $0.5 d^{-1}$. Estos cultivos tuvieron una velocidad específica de crecimiento en la fase pseudo-estable de $58.6 \pm 19.4 \% \mu_{max}$. En el resto del documento se hace referencia a estos cultivos como matraz 60% μ_{max} .

Al inicio del estudio de estos cultivos se definió un diseño experimental 2^2 con 2 variables que fueron la concentración celular inicial y la tasa de dilución. Conforme avanzó el experimento, los tratamientos con la misma tasa de dilución que habían iniciado con diferente concentración celular inicial alcanzaron la misma concentración celular (Figura A5). Por lo tanto, la variable de concentración inicial

dejo de ser significativa y se convirtió en un experimento con 2 tasas de dilución, cada una por duplicado.

El sistema de recambio de medio fue iniciado desde el inicio del cultivo. Se alcanzó un estado pseudo-estable a los 10 días para el cultivo 60% μ_{\max} y a los 13 días para el cultivo 10% μ_{\max} .

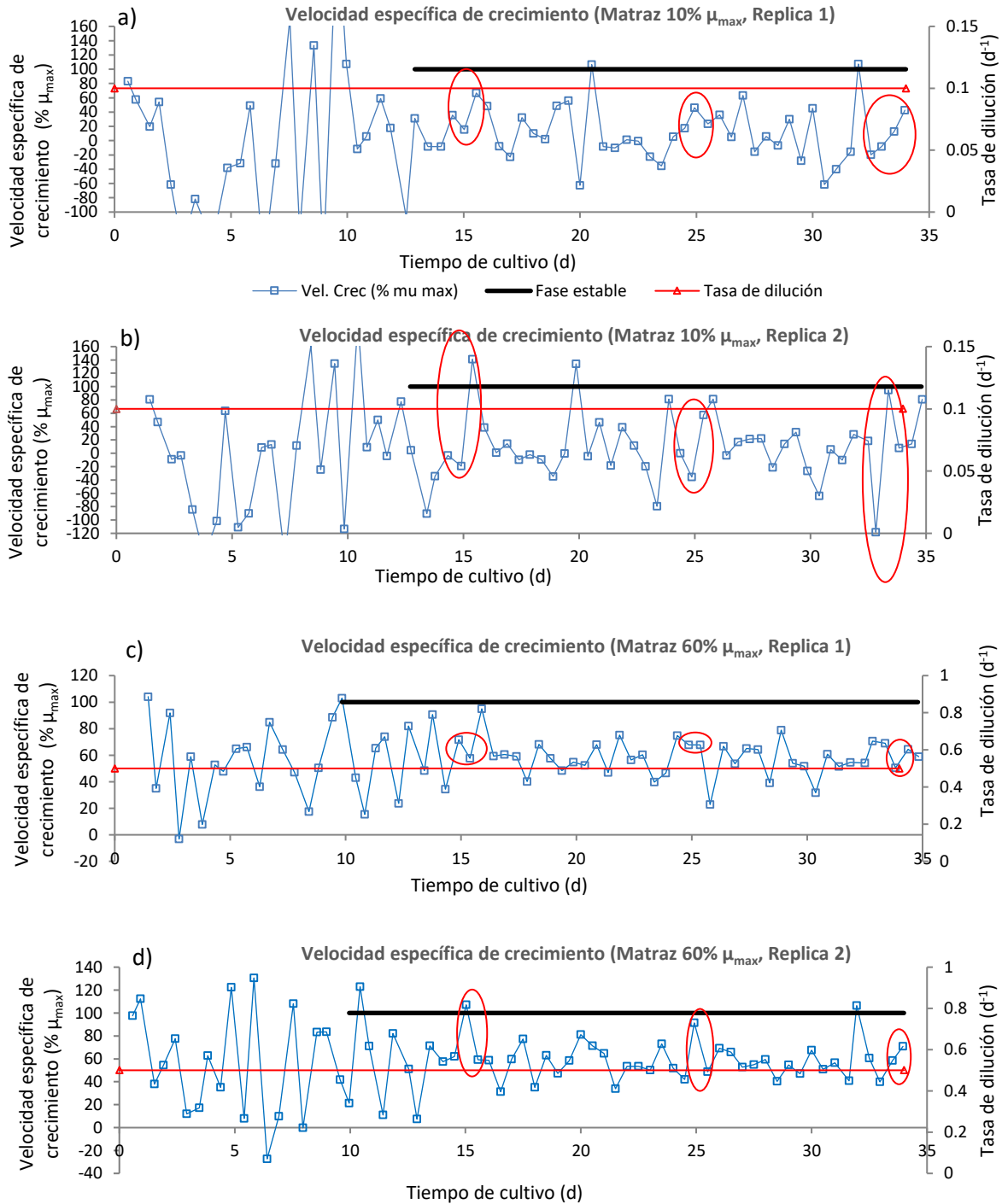


Figura 13. Periodos de estado estable en cultivos en matraz. a) y b) 10% μ_{max} , y c) y d) 60% μ_{max} . Se muestra en la línea sólida horizontal negra los periodos considerados como estado estable. La línea azul representa las velocidades específicas de crecimiento durante el cultivo. La línea roja representa la tasa de dilución utilizada. Con óvalos rojos se señalan los puntos de muestreo donde se determinó la productividad, rendimiento y el perfil de glicosilación y de variantes de carga del anticuerpo.

La definición de los periodos de los cultivos en el estado estable (cultivo en perfusión) y pseudo-estable (cultivos semicontinuos en matraz) se realizó a partir del análisis de varios parámetros. Los parámetros considerados fueron: la velocidad de crecimiento, la concentración celular y las concentraciones de los metabolitos. El análisis de los parámetros en el estado estable se realizó a partir de los gráficos correspondientes a cada parámetro localizados en los Anexos de este escrito (Figuras A5, A6 y A7 para cultivos semicontinuos en matraz y Figuras A10, A11, A12 y A13 para cultivos de perfusión en biorreactor) así como del análisis de los datos crudos. El producto de este análisis es la construcción de los gráficos mostrados en las Figuras 12 y 13. En estos se pueden visualizar las velocidades de crecimiento con respecto al tiempo, junto con la tasa de dilución. La línea horizontal sólida de color negro indica los periodos del estado estable para cultivos en perfusión o pseudo-estable para los cultivos en matraz. En estos periodos se observó la estabilización de la velocidad de crecimiento, la concentración celular y concentraciones de metabolitos en estas etapas de cultivo. Se calculó el promedio y la desviación estándar de cada uno de los parámetros durante los estados estables, los cuales están reportados en las Tablas 4 a 7.

En el cultivo continuo de perfusión de manera continua se extrajo medio gastado junto con células metabolitos y producto y, simultáneamente, se agregó nuevo medio de cultivo. Por consiguiente, fue posible alcanzar un estado estable de baja variabilidad para los parámetros estudiados en estos cultivos. La incorporación del sistema de retención celular permitió alimentar a altas tasas de dilución evitando el lavado del cultivo. En consecuencia, se alcanzaron mayores concentraciones celulares que en los cultivos en matraz.

Los cultivos semicontinuos en matraz simulaban un cultivo quimiostato interrumpido. En estos cultivos se realizó la extracción de medio de cultivo gastado junto con metabolitos, células y producto dos veces al día. Esto tuvo como consecuencia que los parámetros estudiados de cada cultivo estuvieran fluctuando en un rango. Es decir, después de un recambio de cultivo se tuvo el punto más bajo de concentración celular y de producto, así como el mayor de concentración de nutrientes. Al final de cada ciclo se tuvo el punto de mayores concentraciones celulares y de producto, y

por el contrario la menor de nutrientes. Por estas características fluctuantes de los cultivos semicontinuos en matraz no se alcanzó un estado estable real. Sin embargo, durante el transcurso del cultivo se alcanzó un estado de baja variabilidad entre los rangos de los parámetros estudiados, al que se llamó estado pseudo-estable.

7.1.1 Puntos de muestreo para el análisis de productividad, rendimiento y perfiles de glicosilación y de variantes de carga

Una vez definidos los periodos de estado estable, se seleccionaron 3 puntos de muestreo para cada cultivo. Se buscó que los muestreos estuvieran separados en el tiempo, de manera tal que la proteína evaluada a un tiempo previo hubiera sido recambiada en alto porcentaje al momento del siguiente muestreo. Para esto se tomó en cuenta su tiempo de residencia.

En la Tabla 3 y Figuras 12 y 13 (óvalos rojos) se muestran los tiempos de cultivo que fueron analizados. Estos tiempos se encuentran dentro de la fase estable o pseudo-estable de los cultivos. Para los cultivos de perfusión se analizaron muestras independientes. Para los cultivos en matraz, debido al bajo volumen de muestreo se conjuntó el volumen muestreado de varios puntos. Se conjuntó el muestreo de 2 puntos consecutivos para el cultivo matraz 60% μ_{max} y de 3 puntos para el matraz 10% μ_{max} a los 15 y 25 días, y 4 puntos en los análisis de 33 días.

Tabla 3. Puntos de muestreo en los diferentes cultivos. Se muestran los periodos de muestreo de cada uno de los cultivos, así como el número de réplicas estudiadas en cada uno de ellos.

Tratamiento	Perfusión 50% μ_{max}	Perfusión 20% μ_{max}	Matraz 60% μ_{max}	Matraz 10% μ_{max}
Punto de muestreo (días)	10.2	16.1	R1 14.9-15.4	R1 14.3-15.4
	13.8	18.7	R1 24.9-25.4	R1 24.4-25.4
	20.0	21.1	R1 33.8-34.4	R1 32.9-34.4
			R2 15.0-15.5	R2 14.5-15.5
			R2 24.9-25.5	R2 24.5-25.5
			R2 34.0-34.5	R2 32.5-34.0
Replicas analizadas	3	3	6	6

7.1.2 Tasa de dilución y tiempo de residencia

En la Tabla 4 se muestran las tasas de dilución utilizadas en la fase estable en los diferentes cultivos. Se puede observar que en los cultivos en perfusión se utilizaron tasas de dilución mayores. En consecuencia, los tiempos de residencia en los cultivos en perfusión fueron menores que los de cultivos en matraz.

Tabla 4. Tasa de dilución y tiempo de residencia en los cultivos. Se muestra la media y la desviación estándar de las tasas de dilución en los distintos cultivos, así como del tiempo de residencia del anticuerpo en el cultivo.

Cultivo	Tasa de dilución (d ⁻¹)	Tiempo de residencia (d)
Perfusión 50% μ_{\max}	0.996 ± 0.115	1.0
Perfusión 20% μ_{\max}	0.550 ± 0.006	1.8
Matraz 60% μ_{\max}	0.500 ± 0.008 ⁽¹⁾	2.0
Matraz 10% μ_{\max}	0.100 ± 0.008 ⁽¹⁾	10.0

(1) El recambio de medio de cultivo en matraz fue realizado con pipetas graduadas de 10 mL, la desviación estándar calculada corresponde a la variación de medida de la pipeta.

7.1.3 Velocidad específica de crecimiento, viabilidad y concentración celular

En la Tabla 5 se muestran los valores de viabilidad, concentración y velocidad específica de crecimiento obtenidos en la fase estable y pseudo-estable de los cultivos estudiados.

Los cultivos de perfusión tuvieron concentraciones alrededor de 15×10^6 cel/mL. Por otro lado, los cultivos semicontinuos tuvieron concentraciones celulares menores. Se obtuvo mayor viabilidad celular a mayores velocidades de crecimiento. La velocidad de crecimiento fue controlada en mayor medida en los cultivos en perfusión que en los cultivos en matraz. Los cultivos perfusión 50% μ_{\max} , y matraz 60% μ_{\max} fueron los que presentaron las mayores velocidades de crecimiento. Por consiguiente, se hará referencia en puntos subsecuentes a ambos cultivos como cultivos de alta velocidad de crecimiento. Por otro lado, los otros dos cultivos, perfusión 20% μ_{\max} , y matraz 10% μ_{\max} tuvieron velocidades de crecimiento menores al comparar con los de alta velocidad de crecimiento. Por consiguiente, se hará referencia en puntos subsecuentes a ambos cultivos como cultivos de baja velocidad de crecimiento.

En el estado estable de los cultivos estudiados se controló la velocidad de crecimiento predefinida. La excepción fue del cultivo en matraz 10% μ_{max} que fue operado a condiciones nutrimentales muy deficientes. Los cultivos en perfusión fueron capaces de alcanzar concentraciones celulares predefinidas mediante la manipulación de la tasa de dilución y retención celular.

Tabla 5. Viabilidad celular, concentración y velocidad de crecimiento. Se muestran la media y desviación estándar para estos parámetros en el estado estable.

Cultivo	Viabilidad celular	Concentración (10^6 cel /mL)	Velocidad de crecimiento (% μ_{max})
Perfusión 50% μ_{max}	94.3 \pm 1.5	15.5 \pm 0.7	52.8 \pm 5.3
Perfusión 20% μ_{max}	84.6 \pm 1.9	13.8 \pm 0.8	19.1 \pm 2.0
Matraz 60% μ_{max}	99.6 \pm 0.4	8.5 \pm 1.5	58.6 \pm 19.4
Matraz 10% μ_{max}	41.2 \pm 8.8	3.3 \pm 0.9	10.4 \pm 44.8

Nuestros resultados mostraron el patrón previamente reportado en la literatura especializada, donde, a menor tasa de dilución, se observó menor concentración celular y viabilidad (Vergara et al., 2014, Li et al., 2013, Robinson et al., 1991 y Hayter et al., 1993).

Goudar y colaboradores (2010) obtuvieron viabilidades específicas de crecimiento en el rango de 81.0 a 91.6%. Y tuvieron concentraciones en el rango de $12 \pm 3 \times 10^6$ cel/mL a una tasa de dilución de 1.5 d^{-1} en cultivo de perfusión. Y tuvieron una velocidad de crecimiento de 0.011 h^{-1} . Por otro lado, Altamirano y colaboradores (2001) estudiaron un cultivo quimiostato a una tasa de dilución de 0.475 d^{-1} . La cual es el equivalente al 49% de la μ_{max} en este estudio. Resultó en concentraciones celulares de $2.08 \pm 0.13 \times 10^6$ cel/mL.

7.2 Productividad y rendimiento

En la Tabla 6 se muestra la productividad y el rendimiento obtenidos en los distintos cultivos estudiados. Los cultivos con velocidades de crecimiento bajas tuvieron mayor productividad que los cultivos con velocidades de crecimiento altas.

Tabla 6. Rendimiento y productividad de AcM en los distintos cultivos. Se muestra la media y la desviación estándar del rendimiento y productividad de AcM en los distintos cultivos.

Cultivo	Rendimiento (mg/L)	Productividad (pg/cel-día)
Perfusión 50% μ_{max}	68.5 \pm 9.6	4.5 \pm 0.5
Perfusión 20% μ_{max}	382.7 \pm 61.9	15.6 \pm 2.2
Matraz 60% μ_{max}	65.7 \pm 21.6	3.8 \pm 1.2
Matraz 10% μ_{max}	171.1 \pm 38.8	7.1 \pm 2.3

El rendimiento fue 5.6 veces mayor para el cultivo 20% de μ_{max} que para el cultivo 50% de μ_{max} . Comparando el sistema en matraz 60% μ_{max} con la perfusión a 50% de μ_{max} , se observaron rendimientos muy similares. Para matraz 10% μ_{max} se observó un rendimiento 2.65 veces mayor que para el matraz 60% μ_{max} , pero fue inferior que el de perfusión al 20% de μ_{max} . El cultivo perfusión 20% de μ_{max} presentó el mayor rendimiento. En cuanto a productividad, se obtuvieron relaciones similares a las de rendimiento, siendo superior la de perfusión a 20% μ_{max} . Concluimos que a menores velocidades de crecimiento se obtiene mayor productividad y rendimiento de la proteína recombinante.

Las productividades determinadas en este estudio fueron comparables a las determinadas por Clincke y colaboradores (2013), quienes obtuvieron productividades para una IgG1 en el orden de 10 pg/cel-día en cultivos de perfusión por filtración tangencial. Por otro lado, la tendencia de la productividad encontrada concuerda con lo reportado por Omasa y colaboradores (2010), que observaron que al incrementar la velocidad específica de crecimiento disminuye la velocidad de producción de proteína recombinante.

7.3 Metabolismo a diferentes velocidades de crecimiento

En la Tabla 7 se muestran las velocidades de consumo y producción de nutrientes en la fase estable. Los nutrientes determinados fueron glucosa, glutamina, glutamato, lactato y amonio. Los signos negativos indican consumo y los positivos producción. La glucosa y la glutamina fueron consumidos. A partir de estos nutrientes se produjo su metabolito lactato y amonio respectivamente. Se puede observar que la glutamina fue consumida en los cultivos de alta velocidad de crecimiento. Por el contrario, fue acumulada en los cultivos de baja velocidad de crecimiento.

Tabla 7. Velocidades de consumo de nutrientes en el estado estable. Se muestra la media y desviación estándar de las velocidades de consumo de los diferentes nutrientes en el estado estable.

Cultivo	q (fmol Glc/cel·h)	q (fmol Gln/cel·h)	q (fmol Glu/cel·h)	q (fmol Lac/cel·h)	q (fmol Amo/cel·h)
Perfusión 50% μ_{\max}	-56.6 ± 4.1	-14.0 ± 1.3	-0.69 ± 0.6	37.7 ± 10.0	13.8 ± 2.1
Perfusión 20% μ_{\max}	-49.4 ± 2.6	-9.0 ± 0.4	0.02 ± 0.3	0.3 ± 0.4	14.0 ± 0.7
Matraz 60% μ_{\max}	-55.8 ± 9.1	-14.1 ± 2.0	-0.4 ± 0.8	26.8 ± 13.6	9.4 ± 9.8
Matraz 10% μ_{\max}	-45.2 ± 15.8	-8.1 ± 4.2	2.5 ± 3.7	6.7 ± 16.4	10.0 ± 23.6

En la Tabla 8 se muestran los rendimientos de lactato y amonio en la fase estable. Los cultivos a altas velocidades de crecimiento tuvieron mayores rendimientos de lactato que los cultivos de baja velocidad de crecimiento. Por el contrario, los cultivos de baja velocidad de crecimiento tuvieron mayores rendimientos de amonio que los cultivos de alta velocidad de crecimiento.

Tabla 8. Rendimiento de lactato y amonio en el estado estable expresados en relación mol/mol. Se muestra la media y desviación estándar del rendimiento en el estado estable.

Cultivo	Y _{Lac/Glc}	Y _{Amo/Gln}
Perfusión 50% μ_{\max}	0.66 ± 0.16	0.98 ± 0.1
Perfusión 20% μ_{\max}	0.01 ± 0.01	1.55 ± 0.04
Matraz 60% μ_{\max}	0.48 ± 0.22	0.67 ± 0.69
Matraz 10% μ_{\max}	0.09 ± 0.38	1.64 ± 3.84

En la Tabla 9 se muestran las concentraciones de nutrientes determinados en los cultivos en la fase estable. Los nutrientes determinados fueron glucosa, glutamina, glutamato, lactato y amonio. Los cultivos de alta velocidad de crecimiento tuvieron mayor concentración de glucosa, glutamina y lactato que los cultivos de baja velocidad de crecimiento. Por otro lado, los cultivos de baja velocidad de crecimiento tuvieron mayor concentración de glutamato y amonio que los cultivos de alta velocidad de crecimiento.

Tabla 9. Concentraciones de nutrientes en el estado estable. Se muestra la media y desviación estándar para las concentraciones de los distintos nutrientes determinados en el estado estable.

Cultivo	Glc (mM)	Gln (mM)	Glu (mM)	Lac (mM)	Amo (mM)
Perfusión 50% μ_{\max}	9.41 ± 1.40	0.77 ± 0.16	1.30 ± 0.22	14.03 ± 3.51	5.14 ± 0.44
Perfusión 20% μ_{\max}	1.40 ± 0.45	0.58 ± 0.12	1.57 ± 0.18	0.21 ± 0.22	8.41 ± 0.23
Matraz 60% μ_{\max}	13.54 ± 3.18	1.07 ± 0.72	1.37 ± 0.08	7.97 ± 3.60	4.69 ± 2.34
Matraz 10% μ_{\max}	1.11 ± 1.04	0.38 ± 0.20	2.84 ± 0.54	2.48 ± 1.28	7.09 ± 0.87

A partir del análisis de las Tablas 7 y 9 se determinó que los cultivos de alta velocidad de crecimiento en comparación con los de baja velocidad de crecimiento,

tuvieron mayores velocidades de consumo de glucosa y glutamina. Asimismo, tuvieron mayores concentraciones de nutrientes en la fase estable. Para realizar el comparativo metabólico se clasificaron los cultivos como: cultivos de concentraciones de nutrientes altos (perfusión 50% μ_{\max} y matraz 60% μ_{\max}) y cultivos con concentraciones de nutrientes bajos (perfusión 20% μ_{\max} y matraz 10% μ_{\max}).

Estudios previos han mostrado que el empleo de glucosa y glutamina como las principales fuentes de carbono y energía en los cultivos (Cruz et al., 1999, Altamirano et al., 2001), permite que su monitoreo, así como de sus metabolitos, sea empleado como un indicador representativo del comportamiento metabólico del cultivo.

Los cultivos con altas concentraciones de nutrientes tuvieron una velocidad de consumo de glucosa 1.17 veces mayor que los cultivos con bajas concentraciones de nutrientes. Adicionalmente, tuvieron concentraciones residuales de glucosa de al menos 6.61 veces mayor que los cultivos con bajas concentraciones de nutrientes. Asimismo, tuvieron un rendimiento promedio de lactato $Y_{\text{Lac/Glc}}$ mol/mol de 0.57, comparado con 0.05 a bajas concentraciones de nutrientes. La reducción en el rendimiento de lactato $Y_{\text{Lac/Glc}}$ mol/mol a bajas concentraciones de nutrientes podría deberse a que gran parte del piruvato formado durante la glucólisis está entrando al TCA. Por lo tanto, a menor concentración de nutrientes la glucosa es metabolizada por rutas más energéticas (Cruz et al., 1999 y Altamirano et al., 2001). Por el contrario, si se tuvieran valores de $Y_{\text{Lac/Glc}}$ mol/mol cercanos a 2 indicarían que la glucosa está formando mayoritariamente lactato sin alimentar al TCA (Altamirano et al., 2001).

Los cultivos con altas concentraciones de nutrientes tuvieron una velocidad de consumo de glutamina 1.64 veces mayor que los de bajas concentraciones de nutrientes. Adicionalmente, tuvieron concentraciones residuales de glutamina de al menos 1.32 veces mayor que los cultivos con bajas concentraciones de nutrientes. En cambio, tuvieron un rendimiento promedio de amonio $Y_{\text{Amm/Gln}}$ mol/mol de 0.82 a altas concentraciones de nutrientes comparado con 1.6 a bajas concentraciones de nutrientes. Por su parte, la concentración de glutamato a altas concentraciones de

nutrientes fue 15% menor a la del medio a la entrada del reactor. En el caso de perfusión 20% μ_{max} , la concentración promedio de glutamato en el cultivo fue igual a la del flujo de entrada. Por otro lado, se observó un comportamiento diferente para el matraz 10% μ_{max} donde se acumuló el glutamato durante el cultivo hasta una concentración 1.82 veces mayor que la alimentada. En este sentido, se ha descrito que la glutamina es desaminada para generar glutamato por la glutaminasa siendo catabolizado por dos rutas catabólicas. Una cataboliza con alta oxidación mediante la desaminación por la enzima glutamato deshidrogenasa (G1DH) y otra con oxidación parcial formando un ciclo en el TCA mediante la acción de la glutamato-piruvato transaminasa (GPTA). En esta última, el amonio del glutamato es transaminado a piruvato (el cual contiene esqueletos de carbono provenientes de la oxidación parcial de la glutamina en el TCA) para obtener alanina, permitiendo sugerir que esta ruta pudiera ser un mecanismo del balance de la sobreproducción de amonio (Cruz et al., 1999, Altamirano et al., 2013).

Las diferencias en las velocidades de consumo de glutamina en el cultivo, así como el rendimiento de amonio a las distintas concentraciones de nutrientes, pueden deberse a que a altas concentraciones de glucosa y glutamina pudiera predominar la acción de la GPTA (Cruz et al., 1999, Altamirano et al., 2013). Por otro lado, a bajas concentraciones de glucosa y de glutamina, metabólicamente pudiera estarse utilizando una ruta más energética teniendo mayor actividad la G1DH. Por el contrario, pudiera tener baja actividad la GPTA, reduciéndose la formación del ciclo en el TCA para generar alanina. Por consiguiente, este ajuste metabólico podría explicar la menor velocidad de consumo de glutamina y el incremento del rendimiento de amonio $Y_{Amm/Gln}$ (Cruz et al., 1999, Altamirano et al., 2013). Por otra parte, se observó un incremento de la concentración de glutamato en el cultivo matraz 10% μ_{max} . Este incremento, pudiera deberse a que, a bajas concentraciones nutrimentales del cultivo, se incrementa el catabolismo de aminoácidos. Donde, el primer paso consiste en la transaminación del aminoácido siendo el aceptor del amonio el alfa-cetoglutarato para formar glutamina (Mathews et al., 2003).

El comportamiento que se observó para el metabolismo de la glucosa coincide con estudios previamente reportados. En los que han encontrado que, a altas tasas de

dilución y altas velocidades de crecimiento, la velocidad de consumo de glucosa es ligeramente mayor, obteniéndose mayores rendimientos de lactato y entrando en menor proporción los carbonos de la glucosa al TCA (Ramírez y Mutharasan, 1991, Vergara et al., 2014, Li et al., 2013).

El comportamiento que observamos para el rendimiento de amonio con respecto a la glutamina fue similar al observado por Hyter y colaboradores (1993). Donde, encontraron incremento del rendimiento de amonio $Y_{Amm/Gln}$ mol/mol al reducir la tasa de dilución.

La velocidad específica de producción y consumo de metabolitos en los cultivos de perfusión como matraz, mostrados en la Tabla 7, son comparables a los reportados por otros autores. Altamirano y colaboradores (2001) reportaron valores similares para un cultivo continuo con células CHO (quimiostato) con una tasa de dilución de 0.475 d^{-1} . Donde utilizaron un medio de cultivo sin glutamina pero con 7 mM de glutamato y 9.8 mM de glucosa. Goudar y colaboradores (2010) estudiaron cultivos en perfusión utilizando una tasa de dilución de 1.5 d^{-1} , donde las condiciones nutrimentales de su medio de cultivo son más semejantes a las de nuestro estudio. Su cultivo contenía 38.8 mM de glucosa y 7 mM de glutamina. Altamirano y colaboradores (2001) obtuvieron velocidades de $q_{Glc} -70.9$, $q_{Lac} 93.6$, $q_{Glu} -22.5$ y $q_{Amo} 9.36 \text{ fmol/cel}\cdot\text{h}$. Es de observar que en el caso de la velocidad específica de consumo de glutamina de nuestros resultados es cercana a la de consumo de glutamato de Altamirano y colaboradores (2001), pero es muy diferente a la que obtuvimos para glutamato. Esta diferencia se debe a que la única fuente de glutaminólisis en el trabajo de Altamirano y colaboradores (2001) es el glutamato y en nuestro caso tenemos dos fuentes, glutamina y glutamato. Por otro lado, Goudar y colaboradores (2010) obtuvieron las siguientes velocidades de consumo y producción de metabolitos, $q_{Glc} -50.8$, $q_{Lac} 69.16$, $q_{Gln} -13.33$, $q_{Glu} 6.25$ y $q_{Amo} 20.8 \text{ fmol/cel}\cdot\text{h}$.

7.4 Definición de conjuntos de cultivos para la comparación de los parámetros analizados del AcM

La pregunta de investigación de este proyecto fue: si la velocidad de crecimiento celular determina los perfiles de glicosilación y de variantes de carga de un anticuerpo monoclonal recombinante en cultivo.

En primera instancia se determinó el comportamiento de la velocidad de crecimiento en los 4 cultivos realizados: perfusión 50%, perfusión 20% μ_{max} , matraz 60% μ_{max} y matraz 10% μ_{max} . Las cuales se muestran en la Tabla 5. Como siguiente paso se determinaron los perfiles de glicosilación y de variantes de carga en los puntos de muestreo indicados en la Tabla 3. Los resultados del análisis del perfil de glicosilación se encuentran en la Tabla 13, y los del perfil de variantes de carga en la Tabla 15. Es de mencionar que la mayoría de los parámetros analizados presentaron mayor variabilidad en los cultivos en matraz, en especial el cultivo matraz 10% μ_{max} .

Las velocidades de crecimiento obtenidas en los cultivos de perfusión presentaron muy baja variabilidad. Sin embargo, las velocidades de crecimiento en los cultivos en matraz mostraron mayor variabilidad, siendo mayor en el cultivo en matraz 10% μ_{max} . Finalmente, para realizar el análisis estadístico y conocer la influencia de la velocidad de crecimiento sobre los perfiles de glicosilación y de variantes de carga solamente se consideraron los cultivos en perfusión.

Para realizar el análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student para comparar las medias poblacionales de los cultivos de perfusión 50% y 20% de μ_{max} , que representan alta y baja velocidad específica de crecimiento respectivamente. En la Tabla 10 se muestran los puntos del cultivo considerados para el análisis estadístico.

Tabla 10. Puntos de muestreo de los cultivos de perfusión considerados para el análisis estadístico.

Conjunto de velocidades de crecimiento altas	Conjunto de velocidades de crecimiento bajas
Perfusión 50% μ_{max} , 10.2 días	Perfusión 20% μ_{max} , 16.1 días
Perfusión 50% μ_{max} , 13.8 días	Perfusión 20% μ_{max} , 18.8 días
Perfusión 50% μ_{max} , 20.0 días	Perfusión 20% μ_{max} , 21.1 días

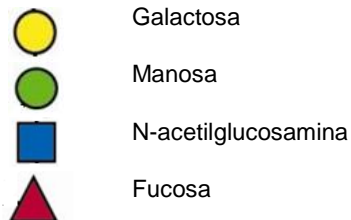
Se determinó que existía efecto de la velocidad de crecimiento sobre el parámetro analizado si el dictamen de la prueba t de Student era que las medias poblacionales eran diferentes. Posteriormente se revisó la tendencia de las medias para determinar si el incremento de la velocidad tenía un efecto positivo o negativo sobre el valor del parámetro.

7.5 Perfil de glicosilación

Se realizó el análisis del perfil de glicosilación a muestras del estado estable de los cultivos en estudio de acuerdo con lo descrito en el punto 6.15. En la Figura 14 se muestra un cromatograma representativo obtenido de las muestras analizadas por HPLC. En la Tabla 11 se muestra el equivalente de los tiempos de retención con unidades de glucosa y las estructuras de glicanos propuestas utilizadas en este estudio. Una vez determinada la abundancia relativa de las diferentes estructuras de glicanos, estas fueron agrupadas como se indica en la Tabla 12. En la Tabla 13 se reportan las abundancias relativas de los glicanos por grupos y en la Figura 15 se muestran de manera gráfica.

Tabla 11. Glicoformas que fueron consideradas en el análisis cromatográfico del perfil de glicosilación.

Nomenclatura	Estructura	Unidades de glucosa	TR (min)	Nomenclatura	Estructura	Unidades de glucosa	TR (min)
N2M3		4.12	64.6	M5		6.22	88.5
N2FM3		4.71	72.3	A2G1 (1,6)		6.41	90.3
N2FM3N (1,3)		5.04	76.3	A2G1 (1,3)		6.64	92.3
A2		5.48	81.1	A2FG1 (1,6)		6.77	93.4
N2FM3N (1,6)		5.55	81.8	A2FG1 (1,3)		6.87	94.2
Desconocida	Estructura desconocida susceptible a digestion con α -manosidasa y por β -hexosaminidasa	5.85	84.9	A2FG2		7.67	100.6
A2F		5.99	86.3				



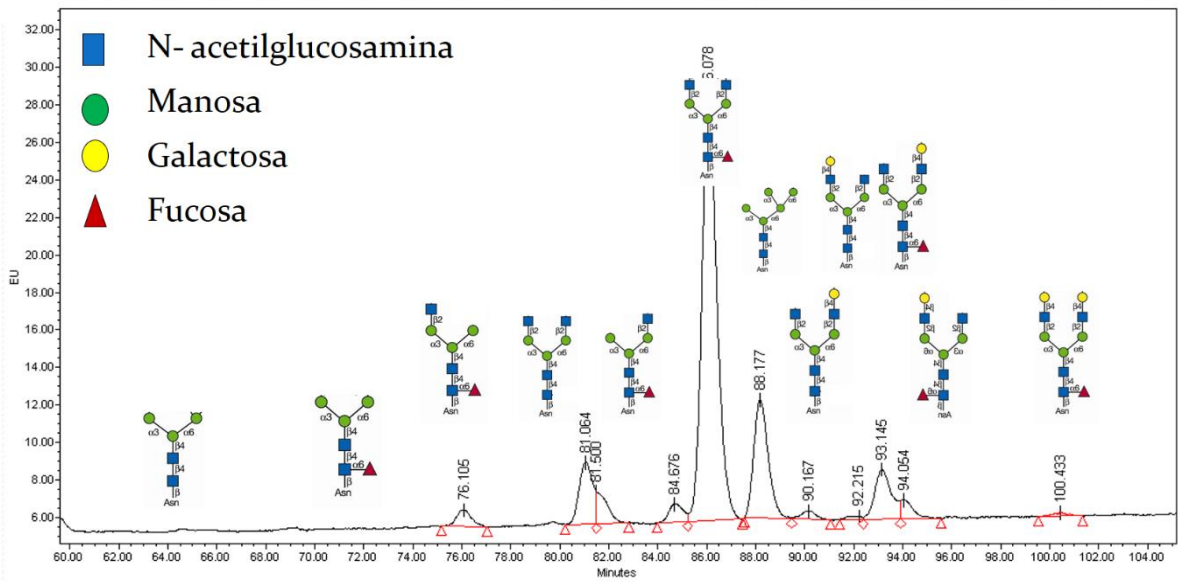


Figura 14. Cromatograma representativo del análisis de glicanos. El tiempo de retención fue directamente proporcional al peso molecular e hidrofiliidad del glicano.

Tabla 12. Clasificación de glicanos por grupos.

Grupo	Estructura
Paucimanosa	
Manosa 5	
Desconocidos	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Estructura desconocida susceptible a digestión con α-manosidasa y por β-hexosaminidasa</p> </div>
Híbridos	
Complejos	
G0	
G1	
G2	
Fucosilados	

Tabla 13. Abundancia relativa de glicofomas en el estado de equilibrio de los distintos cultivos estudiados. Se muestra media y desviación estándar.

Grupo	Perfusión 20% μ_{\max} (%)¹	Perfusión 50% μ_{\max} (%)¹	Matraz 10% μ_{\max} (%)²	Matraz 60% μ_{\max} (%)²
Paucimanosa	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.2 ± 1.3	0.6 ± 0.5
Manosa 5	14.8 ± 1.3	1.8 ± 1.4	7.4 ± 8.1	1.8 ± 1.6
Híbridos	5.3 ± 0.7	3.0 ± 0.7	4.4 ± 2.1	4.7 ± 2.8
No identificado	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.8	4.0 ± 2.9	4.3 ± 1.6
Complejos	76.9 ± 1.7	92.0 ± 1.3	83.0 ± 8.8	88.6 ± 3.2
G0	64.5 ± 1.4	68.0 ± 2.0	76.1 ± 8.1	73.3 ± 3.4
G1	11.9 ± 2.8	22.8 ± 2.4	6.9 ± 1.8	14.4 ± 2.2
G2	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.8 ± 1.0
Fucosilados	72.7 ± 1.3	92.3 ± 1.1	68.0 ± 10.4	89.4 ± 2.8

¹ corresponde a n=3 y ² corresponde a n=6.

En la Tabla 13 y Figura 15, se muestra el perfil de glicosilación de los cultivos estudiados. Se observa similitud en el perfil de glicosilación de los cultivos de alta velocidad de crecimiento (perfusión 50% μ_{\max} y matraz 60% μ_{\max}). Por el contrario, los cultivos de baja velocidad de crecimiento presentan mayores diferencias entre ellos (perfusión 20% μ_{\max} y matraz 10% μ_{\max}). El cultivo matraz 10% μ_{\max} fue el que tuvo mayor variabilidad en los parámetros analizados.

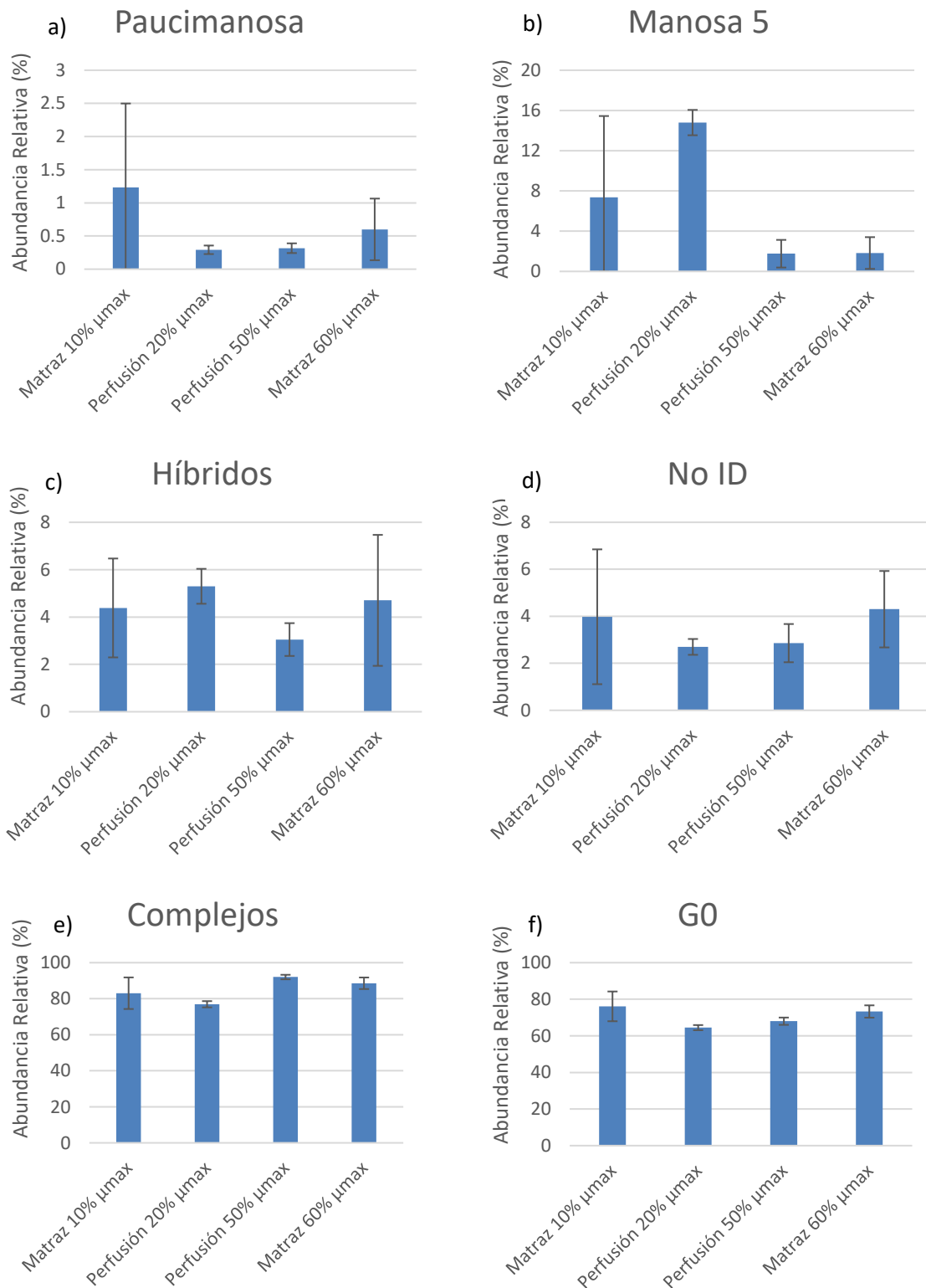


Figura 15. Distribución relativa de los distintos grupos de glicofomas presentes en el anticuerpo de los cultivos estudiados. a) Paucimanosas, b) Manosa 5, c) Híbridos, d) No identificados, e) Complejos, f) G0, g) G1, h) G2, i) Fucosilados.

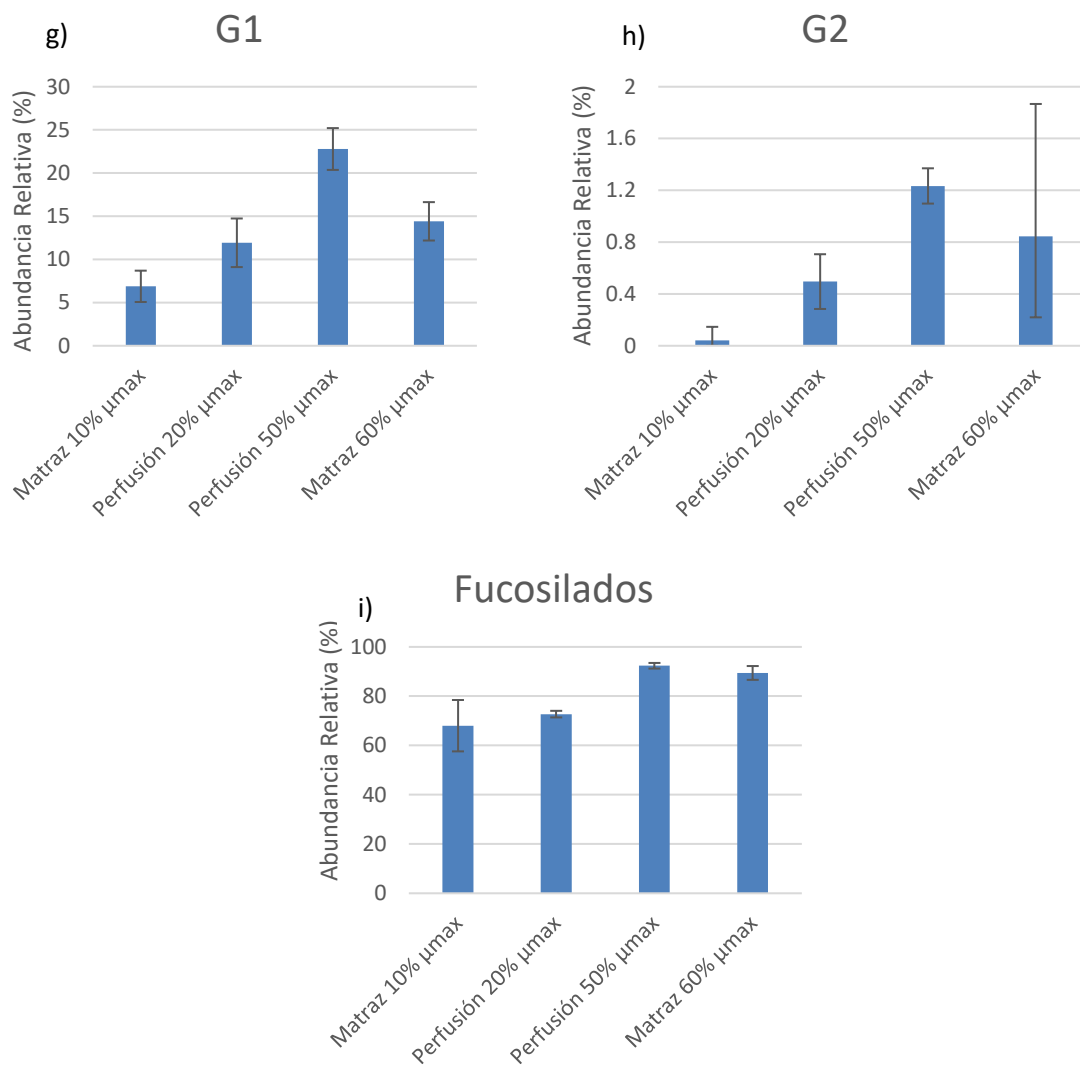


Figura 15. (Continuación). Distribución relativa de los distintos grupos de glicoformas presentes en el anticuerpo de los cultivos estudiados. a) Paucimanosas, b) Manosa 5, c) Híbridos, d) No identificados, e) Complejos, f) G0, g) G1, h) G2, i) Fucosilados.

La Tabla 14, fue construida a partir del análisis estadístico realizado a la distribución de las distintas glicofomas determinadas en los cultivos de perfusión 50% y 20% de μ_{max} . Se muestra el efecto del incremento de la velocidad específica de crecimiento sobre las distintas glicofomas.

Los glicanos manosa 5 e híbridos disminuyeron al incrementar la velocidad específica de crecimiento. Por el contrario, los glicanos complejos, G0, G1, G2 y fucosilados incrementaron. Y los glicanos paucimanosa, G0 y el glicano no identificado no presentaron cambios.

Tabla 14. Efecto de la variación de la velocidad específica de crecimiento sobre las distintas glicofomas.

Variable dependiente	Efecto
Paucimanosa	No
Manosa 5	Disminuye
Híbridos	Disminuye
No identificado	No
Complejos	Incrementa
G0	No
G1	Incrementa
G2	Incrementa
Fucosilados	Incrementa

Los cultivos de perfusión 50% y 20% μ_{max} , tuvieron otras diferencias que están relacionadas a la velocidad de crecimiento. El cultivo de perfusión 50% μ_{max} tuvo mayor concentración de nutrientes y menor productividad que el cultivo 20% μ_{max} . Se observó un incremento de 8.2 veces en la abundancia relativa del glicano manosa 5 al decrecer la velocidad de crecimiento. El incremento de glicanos manosa 5 ($Man_5GlcNAc_2$) representa la ausencia de maduración de este glicano en el Golgi para formar un glicano híbrido con GlcNAc en una antena, teniendo varias posibles causas. Por la baja disponibilidad de UDP-GlcNAc, por baja actividad del transportador UDP-GlcNAc y/o insuficiente actividad de GnTI.

Se encontró un incremento de 1.7 veces de glicanos híbridos al decrecer la velocidad de crecimiento. El incremento de glicanos híbridos representa la ausencia de maduración de este glicano para formar un glicano G0 mediante la incorporación de GlcNAc. La causa del incremento de los glicanos híbridos puede deberse al igual que el glicano manosa 5 a baja disponibilidad de UDP-GlcNA y/o a baja actividad de transportadores de UDP-GlcNAc. A diferencia del glicano manosa 5 pudiera estar deficiente la actividad de la GnTII.

Se tuvo un incremento de 1.27 veces en la abundancia relativa de glicanos fucosilados en el cultivo de mayor velocidad de crecimiento. La incorporación de fucosa puede llevarse a cabo a partir de la formación del glicano híbrido por acción de la FucT. La reducción de glicanos fucosilados en el cultivo de baja velocidad de crecimiento puede explicarse en parte por el incremento en un 13% del glicano manosa 5. Puesto que, la FucT únicamente puede actuar sobre glicanos que tienen al menos una GlcNAc. Por otro lado, el otro 5% de diferencia restante pudiera deberse a varias razones: a baja disponibilidad de GDP-Fuc, a baja disponibilidad de transportadores de FDP-Fuc y/o a baja actividad de FucT.

Se encontró un incremento de 1.19 veces para el grupo de los glicanos complejos en el cultivo de mayor velocidad de crecimiento. En la Tabla 12 se muestran los glicanos incluidos en el grupo de glicanos complejos. El incremento de los glicanos complejos puede explicarse por la reducción del glicano manosa 5 e híbridos. Por lo que, el incremento de la abundancia relativa de glicanos complejos es opuesta al incremento de glicanos híbridos y/o manosa 5. Adicionalmente, este grupo incluye a los glicanos que fueron galactosilados.

No se observó diferencia estadística en la abundancia relativa de los glicanos G0. Los glicanos G0 son un glicano de procesamiento intermedio. Para tener un glicano G0 es necesaria la actividad de la enzima GnTII para incorporar GlcNAc al glicano híbrido. Subsecuentemente, el glicano G0 es galactosilado por la GalT, para generar glicanos G1 y G2.

Se observó un incremento en la abundancia relativa de 1.91 veces para G1 y de 2.4 veces para G2. Sin embargo, la abundancia relativa de G2 fue pequeña (<2%) y con alta variabilidad, por lo que su repercusión sobre la funcionalidad del AcM

producido sería poco significativa. Para que se lleve a cabo la galactosilación es necesaria la actividad de la enzima GalT y la disponibilidad del azúcar nucleotídico UDP-Gal. La ausencia de galactosilación pudiera deberse a la baja disponibilidad de UDP-Gal, a baja actividad del transportador UDP-Gal y/o de la GalT.

En resumen, se tienen como posibles causas de la reducción de la incorporación de GlcNAc, Gal y Fuc: baja biodisponibilidad de azúcares nucleotídicos en el citosol y/o Golgi y baja abundancia y/o actividad de las transferasas y glicosidasas.

Por su parte, se ha reportado en la literatura que la baja disponibilidad de los azúcares nucleotídicos es consecuencia de la baja concentración de sus precursores, principalmente glucosa y nucleótidos y; adicionalmente, de glutamina en el caso de UDP-GlcNAc (Fan et al., 2015, Sou et al., 2015). Asimismo, se ha reportado que cultivos con bajo flujo hacia la ruta de las pentosas fosfato, tienen reducida la síntesis de nucleótidos (Sou et al., 2015). En este sentido, en el cultivo de baja velocidad de crecimiento se tuvo baja concentración de glucosa y glutamina, y, posiblemente, como consecuencia de la baja velocidad de crecimiento pudiera tener una menor síntesis de nucleótidos. Por consiguiente, es posible que la síntesis de los azúcares nucleotídicos este reducida a bajas velocidades de crecimiento y esto explique la reducción de la síntesis de glicanos de alto procesamiento. Por otro lado, además de estar presentes los azúcares nucleotídicos en el citosol es necesaria la presencia y actividad de transportadores específicos para cada uno de ellos. Asimismo, es necesaria la presencia y actividad de las diferentes glicosiltransferasas. Por otro lado, también se ha descrito en la literatura que a altas productividades de proteína, las células sintetizan menos lípidos, lo cual afecta la generación de membrana estructural del Golgi en la cual se encuentran los transportadores y glicosiltransferasas (Sou et al., 2015). Por consiguiente, la alta productividad de proteína pudiera coincidir con baja actividad de las glicosiltransferasas y transportadores de azúcares nucleotídicos. En base a esto, se concluye que las condiciones metabólicas de las células a altas velocidades de crecimiento favorecen: la reducción de los glicanos manosa 5 e híbridos, y el incremento de glicanos complejos y galactosilados. Por lo que, se sugiere que el

incremento de la velocidad específica de crecimiento en cultivos continuos favorece la glicosilación de la proteína recombinante.

7.6 Variantes de carga

Se realizó el análisis de la distribución de variantes de carga a muestras del estado estable de los cultivos en estudio de acuerdo con lo descrito en el punto 6.14.

En la Figura 16 se muestra un cromatograma obtenido mediante cromatografía de intercambio catiónico, compuesto por 3 picos, que corresponden a variantes ácidas (primer pico), a variantes básicas (ultimo pico) y el pico más abundante, la fracción principal (Khawly et al., 2010).

Varios autores han fraccionado estas variantes de carga y han identificado mediante cromatografía acoplada a masas y mapeo peptídico las modificaciones presentes en cada grupo de variantes de carga como se muestra en las Figuras 4 a 6 (sección 2.3).

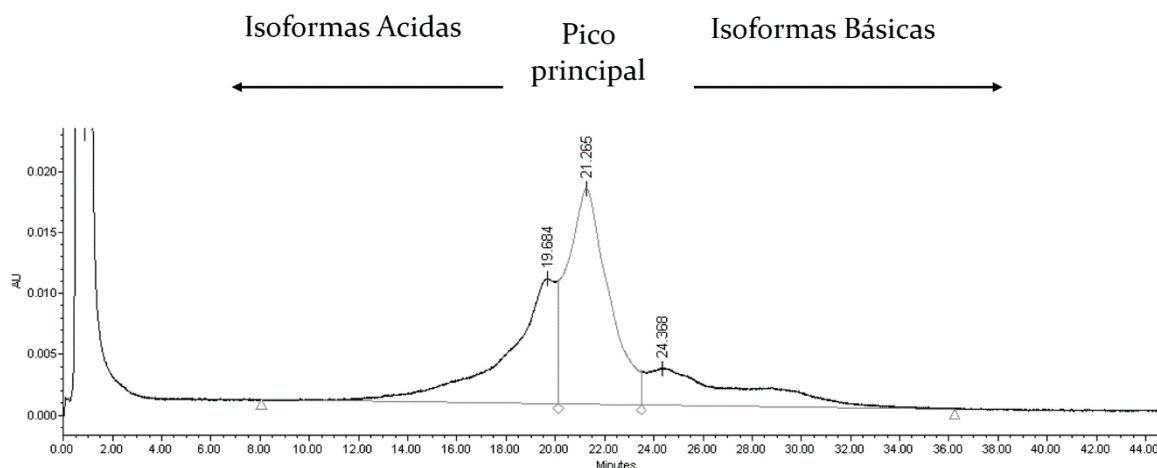


Figura 16. Cromatograma representativo obtenido mediante separación cromatográfica por intercambio catiónico del AcM analizado. Las variantes de carga ácidas al tener carga más negativa presentan menores tiempos de retención. Por otro lado, las básicas al tener carga más positiva presentan mayor tiempo de retención. La fracción principal se encuentra en una retención intermedia entre las otras dos variantes de carga.

En la Figura 17 y Tabla 15, se muestra la distribución relativa de cada una de las variantes de carga. De las 3 variantes de carga la más abundante en los cultivos es la fracción principal, con excepción en el cultivo matraz 10% μ_{max} . Las siguientes en

abundancia fueron las variantes ácidas, y las menos abundantes las variantes básicas.

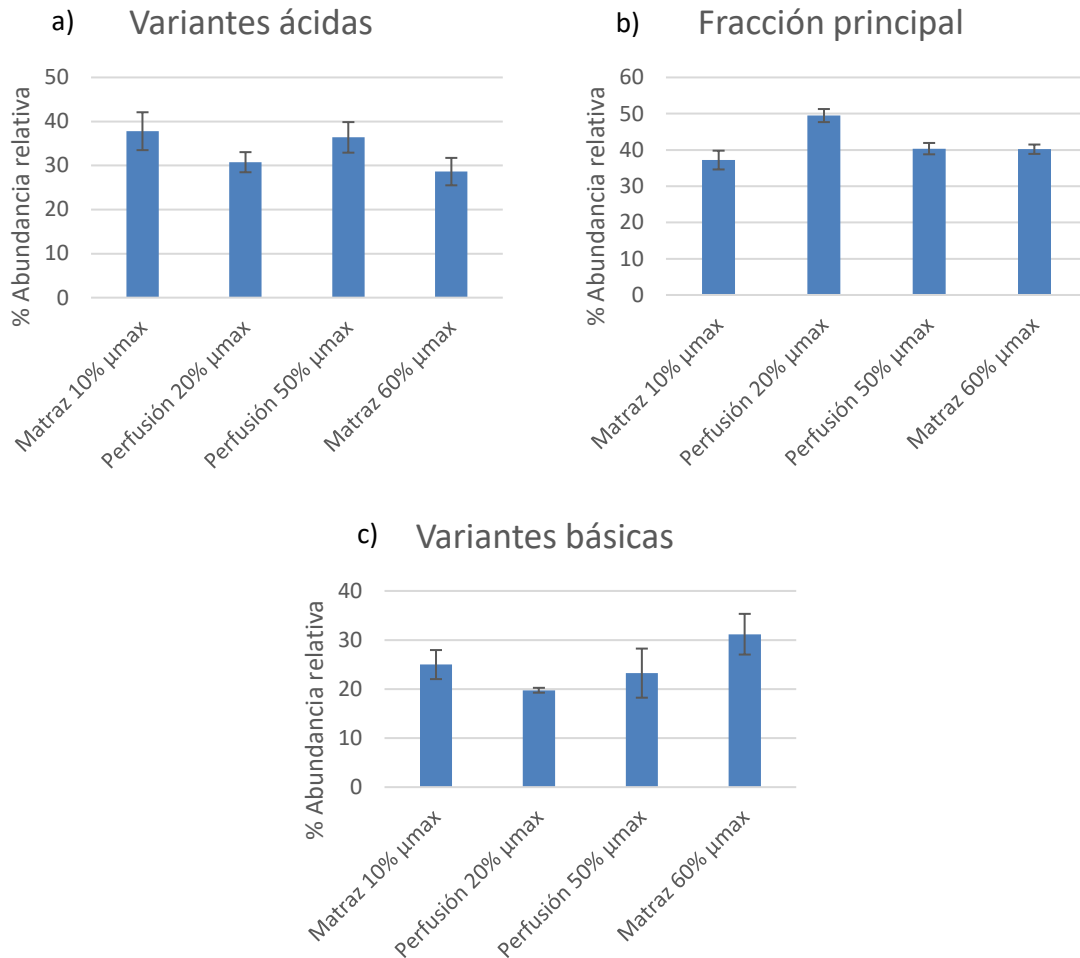


Figura 17. Distribución relativa de las variantes de carga presentes en el anticuerpo de los cultivos estudiados. a) Variantes de carga ácidas, b) fracción principal, c) variantes de carga básicas.

Tabla 15. Perfil de variantes de carga del anticuerpo producido en los distintos cultivos. Se muestra media y desviación estándar.

Cultivo	Ácidas (%)	Principal (%)	Básicas (%)
	Promedio	Promedio	Promedio
Matraz 10% μ_{max}	38 ± 4	37 ± 3	25 ± 3
Perfusión 20% μ_{max}	31 ± 2	49 ± 2	20 ± 0
Perfusión 50% μ_{max}	36 ± 3	40 ± 2	23 ± 5
Matraz 60% μ_{max}	29 ± 3	40 ± 1	31 ± 4

La Tabla 16, fue construida a partir del análisis estadístico realizado a la distribución de las variantes de carga determinadas en los cultivos de perfusión 50% y 20% de μ_{max} . Se muestra el efecto de la variación de la velocidad específica de crecimiento sobre las distintas variantes de carga. Estadísticamente, únicamente la fracción principal tiene efecto por la variación de la velocidad de crecimiento. Donde, al incrementar la velocidad de crecimiento disminuye la fracción principal.

Tabla 16. Efecto de la variación de la velocidad específica de crecimiento sobre la distribución de variantes de carga.

Variable dependiente	Efecto
Variantes de carga ácidas	No
Fracción principal	Disminuye
Variantes de carga básicas	No

Se determinó diferencia estadísticamente significativa para la fracción principal, entre el cultivo de baja velocidad de crecimiento y el de alta velocidad de crecimiento. Se obtuvo una abundancia relativa de 1.22 en el cultivo de baja velocidad de crecimiento en comparación con el de alta. Se ha reportado que la fracción principal es la precursora de las variantes ácidas (Tang et al., 2018). Es de observar que, la reducción de la fracción principal tiene como consecuencia el incremento de las variantes de carga ácidas y básicas.

A altas velocidades de crecimiento, tras la reducción de la fracción principal se tuvo una abundancia relativa de variantes de carga ácidas de 1.16 veces al comparar con el cultivo de baja velocidad de crecimiento. Se ha descrito que las variantes de carga ácidas surgen de modificaciones postraduccionales que suceden principalmente en el medio de cultivo, teniendo como precursor a la fracción principal (Tang et al, 2018). Varios factores del medio de cultivo favorecen la modificación de la fracción principal hacía variantes de carga ácidas entre los que se encuentra la temperatura, pH, tiempo de residencia, baja viabilidad celular y concentración celular (Hossler et al., 2015, Miao et al., 2017, Xie et al., 2016, Tang et al, 2018). Por otro lado, se ha relacionado el incremento de las variantes de carga ácidas en glicoproteínas galactosidadas, aun cuando la galactosa no confiere carga al anticuerpo. Se cree que la presencia de galactosas modifica la estructura

tridimensional del anticuerpo y lo hace más susceptible a modificaciones que generan carga negativa (Tang et al., 2018, Miao et al., 2017 y Xie et al., 2016). En este sentido el cultivo de mayor velocidad de crecimiento tuvo mayor abundancia relativa de galactosas, lo que podría explicar el incremento de variantes de carga ácidas en este cultivo.

A altas velocidades de crecimiento, tras la reducción de la fracción principal se tuvo una abundancia relativa de variantes de carga básicas de 1.15 veces al comparar con el cultivo de baja velocidad de crecimiento. En comparación con las variantes de carga ácidas, se ha descrito en menor medida las condiciones que propician la generación de variantes de carga básicas. Se ha descrito que las variantes de carga básicas surgen de modificaciones postraduccionales que suceden principalmente intracelularmente (Tang et al, 2018).

Fue posible estimar la abundancia relativa de las distintas fracciones de carga en los cultivos estudiados con el método cromatográfico utilizado. Sin embargo, la resolución entre picos fue baja. Esta baja resolución entre picos ocasiona que no conozcamos con exactitud la distribución de las fracciones de carga. En este sentido, pudiera optimizarse la separación mediante la modificación de las condiciones cromatográficas como lo son el pH, buffer, flujo y gradiente utilizado.

El análisis de la distribución de variantes de carga de este proyecto fue realizado mediante cromatografía de intercambio catiónico. Se obtuvo la distribución relativa de variantes de carga ácidas, básicas y de la fracción principal. En la investigación bibliográfica encontramos, algunas modificaciones postraduccionales que han sido encontradas en las distintas fracciones de variantes de carga separadas por cromatografía de intercambio catiónico (punto 2.3 de antecedentes). Las cuales han sido caracterizadas por varios autores mediante la utilización de cromatografía de masas y secuenciación peptídica. Para conocer que modificaciones están ocurriendo en nuestras condiciones de estudio, se tendrían que analizar las distintas fracciones de variantes de carga mediante cromatografía de líquidos acoplada a masas. Asimismo, se podrían identificar específicamente en que aminoácido ocurren las modificaciones mediante mapeo peptídico.

8 LIMITANTES DEL PROYECTO

No se estudiaron a nivel intracelular, los factores involucrados en la glicosilación. Como lo son: las concentraciones de azúcares nucleotídicos, la expresión de glicotransferasas y la expresión de transportadores de azúcares nucleotídicos.

La resolución obtenida para los picos de las diferentes fracciones de carga en el análisis cromatográfico de intercambio catiónico fue baja.

No se caracterizó, que modificaciones postraduccionales están presentes en las distintas variantes de carga del AcM, ni en que aminoácidos.

No se estudiaron cultivos en fase estable fuera del rango de 20-50 % μ_{\max} .

Las conclusiones realizadas están basadas únicamente en la comparación de dos velocidades de crecimiento. Sería ideal contar con un punto adicional para verificar que se sigue la misma tendencia al variar la velocidad de crecimiento.

No resultó un modelo adecuado el matraz 10% μ_{\max} para el control de la velocidad específica de crecimiento. Por lo que no fue posible comparar esta condición de estudio con su contraparte que fue el matraz 60% μ_{\max} . Por otro lado, al ser sistemas de cultivo diferentes el de matraz y el cultivo en perfusión mostraron comportamientos diferentes.

9 CONCLUSIONES

Metabólicamente se observó que a altas concentraciones de nutrientes se obtiene un flujo metabólico poco eficiente. El cual tuvo como característica, altas velocidades de consumo de glucosa y glutamina e incremento del rendimiento de lactato. En contraste, a bajas concentraciones de nutrientes, se sugiere que se tuvo un metabolismo por rutas más energéticas, donde, se tuvo menor velocidad de consumo de nutrientes, se redujo el rendimiento de lactato e incrementó el de amonio.

El sistema de cultivo continuo en perfusión permitió alcanzar estados estables con baja variabilidad en cuanto a: la velocidad específica de crecimiento, concentraciones de nutrientes y parámetros analizados del AcM. Por otro lado, el sistema semicontinuo en matraz presentó mayor variabilidad en especial en el cultivo matraz 10% μ_{max} . Por lo anterior, se concluyó que el sistema de cultivo en matraz no es un modelo adecuado para estudiar el efecto de la velocidad específica de crecimiento en estados estables.

Se encontró que la velocidad específica de crecimiento tuvo efecto sobre la abundancia relativa de los glicanos manosa 5, híbridos, complejos, G1, G2, y fucosilados. Al incrementar la velocidad específica de crecimiento, se redujeron las abundancias relativas de los glicanos manosa 5 e híbridos y se incrementaron las de los glicanos complejos, G1, G2 y fucosilados.

Se determinó que la velocidad específica de crecimiento tuvo efecto sobre la abundancia relativa de la fracción principal de las variantes de carga. Donde, al incrementar la velocidad de crecimiento, decreció la abundancia relativa de la fracción principal.

Se encontró que a menores velocidades de crecimiento se obtiene mayor productividad y rendimiento de la proteína recombinante.

10 PERSPECTIVAS

El sistema continuo a bajas velocidades de crecimiento resultó un proceso ventajoso por su alta productividad. Sin embargo, tuvo la desventaja de incrementar las abundancias relativas de glicanos de bajo procesamiento en especial manosa 5 e híbridos. Para optimizar los cultivos de bajas velocidades de crecimiento en primera instancia es necesario identificar cuales factores están afectando la glicosilación en estas condiciones. Para lo cual, se podría estudiar la expresión de las glicosiltransferasas, los transportadores de azúcares nucleotídicos y las concentraciones de azúcares nucleotídicos a diferentes velocidades de crecimiento. Se podrían estudiar velocidades específicas de crecimiento fuera del rango estudiado. Esto con la finalidad de conocer si la variación de la velocidad de crecimiento sigue la misma tendencia que observamos sobre el perfil de glicosilación y distribución de isoformas fuera del rango estudiado.

Adicionalmente, podría optimizarse el método de cromatografía de intercambio catiónico, para incrementar la resolución entre los picos de las distintas fracciones de carga.

Por otro lado, se podrían analizar las distintas fracciones de variantes de carga del AcM por cromatografía de líquidos acoplada a masas para conocer que modificaciones postraduccionales están ocurriendo y en qué medida. Otro aspecto por considerar es el mapeo peptídico de las distintas fracciones de las variantes de carga del AcM para identificar en que aminoácidos se encuentran las distintas modificaciones postraduccionales.

11 REFERENCIAS

- Ahn W.S, Jeon J.J., Jeong Y.R., Lee S.J., Yoon S.K. (2008). Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 101, 6, 1234-1244.
- An Z. (2018). "Magic bullets" at the center stage of immune therapy: a special issue on therapeutic antibodies. *Protein Cell*, 9, 1, 1–2.
- Alt N., Zhang T.Y., Motchnik P., Taticek R., Quarmby V., Schlothauer T., Beck H., Emrich T., Harris R.J. (2016). Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals*, 44, 291-305.
- Altamirano C., Illanes A., Casablanco A., Gámez X., Cairo J., Gódia C. (2001). Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol*, 17, 1032-1041.
- Altamirano C., Berrios J., Vergara M ·Becerra S. (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electron. J Biotechnol*, 16, 3.
- Andersen D., Bridges T., Gawlitzek M., Hoy C. (2000). Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol Bioeng*, 70, 25-31.
- Antes B, Amon S, Rizzi A, Wiederkum S, Kainer M, Szolar O, Fido M, Kircheis R, Nechansky A. (2007). Analysis of lysine clipping of a humanized Lewis-Y specific IgG antibody and its relation to Fc-mediated effector function. *J Chromatogr B*, 852, 250–256.
- Banks D.D., Gadgil H.S., Pipes G.D., Bondarenko P.V., Hobbs V., Scavezze J.L., Kim J., Jiang X.R., Mukku V., Dillon T.M. (2008). Removal of cysteinylated from an unpaired sulfhydryl in the variable region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody improves homogeneity, stability, and biological activity. *J Pharm Sci*, 97, 2, 764-779.
- Bedoya A., Estrada K., Sanchez A., Ramírez O.T., Altamirano C., Segovia L., Miranda J., Trujillo M.A., Valdez N.A., (2016). Effect of temperature downshift on the transcriptomic responses of Chinese hamster ovary cells using recombinant human tissue plasminogen activator production culture. *PLoS One*, 11(3), 1-26.
- Beyer B., Schuster M., Jungbauer A., Lingg N. (2018). Microheterogeneity of recombinant antibodies: analytics and functional impact. *Biotechnol J*, 13, 1-11.
- Boswell C.A., Tesar D.B., Mukhyala K., Theil F.P., Filder P.J., Khawli L.A. (2010). Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. *Bioconjug Chem*, 21, 2153–2163.
- Butler, Spearman. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 30, 107–112.
- Catak S., Monard G., Aviyente V., Ruiz M.F. (2006). Reaction mechanism of deamidation of asparaginyl residues in peptides: effect of solvent molecules. *J Physical Chem A*, 110,27, 8354-8365.
- Chumsae C., Gaza-Bulseco G., Sun J., Liu H. (2007). Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *J Chromatogr B*, 850, 285–294.
- Chung A.W., Crispin M., Pritchard L., Robinson H., Gorny M.K., Yu X., Bailey C., Ackerman M.E., Scanlan C., Zolla S, Galit A. (2014). Identification of antibody glycosylation structures that predict monoclonal antibody Fc-effector function. *AIDS*, 28, 17, 2523–2530.
- Clincke M.F., Mölleryd C., Zhang Y., Lindskog E., Walsh K., Chotteau V. (2013). Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE biorreactor. Part I. Effect of the cell density on the process. *Biotechnol*, 29, 754-767.

- Clincke M.F., Mölleryd C., Samani P., Lindskog E., Fäldt E., Walsh K., Chotteau V. (2013). Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE biorreactor Part II: applications for antibody production and cryopreservation. *Biotechnol*, 29, 768-777.
- Cruz H.J, Moreira J.L., Carrondo M.J.T. (1999). Metabolic Shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnol Bioeng*, 66, 2, 104-113.
- Deshpande R., Yang T.H., Heinzle E. (2009). Towards a metabolic and isotopic steady state in CHO batch cultures for reliable isotope-based metabolic profiling. *Biotechnol*, 4, 247–263.
- DIONEX. (2009). Monitoring monoclonal antibody stability by cation-exchange chromatography. Noviembre 01, 2016, de DIONEX Sitio web: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4473-AN128-Monitoring-Monoclonal-Antibody-02Feb07-LPN1052-01.pdf>
- Drugbank. (2015). Secukinumab. Mayo 2018, de Drugbank Sitio web: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09029>
- Du Y., Walsh A., Ehrick R., Xu W, May K., Liu H. (2012). Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *MAbs*, 4, 5, 578-585.
- Eldert K.D. (1998). *Immunology: Understanding the Immune System*. John Wiley & Sons.
- Europa A.F., Gambhir A., Fu P.C, Hu W.S. (2000). Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*, 67, 1, 25-34.
- Fan Y., Del Val I.J, Müller C, Sen J.W., Rasmussen S.K., Kontoravdi C., Weilguny D., Andersen M.R. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol Bioeng*, 112, 3, 521-535.
- Ghaderi D., Zhang M., Hurtado N., Varki A. (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 28:1, 147-176.
- Gallagher S., Sasse J. (1998). Protein analysis by SDS-PAGE and detection by coomassie blue or silver staining. *Curr Protoc Pharmacol*, Supplement 2, A.3B.1-A.3B.10.
- GElifesciences. (2014). HiTrap™ Protein A HP. Mayo 20, 2017, de GElifesciences Sitio web: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/litdoc71700200_20161015023835.pdf
- Goetze A.M., Liu Y.D., Zhang Z., Shah B., Lee E., Bondarenko P.V., Flynn G.C. (2011). High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology*, 21, 7, 949–959.
- Goetze A.M, Liu Y.D., Arroll T., Chu L., Flynn G.C. (2012). Rates and impact of human antibody glycation in vivo. *Glycobiology*, 22 ,2, 221–234.
- Goudar C., Biener R., Boisart C., Heidemann R., Piret J., Graaf A., Konstantinov K. (2010). Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D [13C, 1H] COSY NMR spectroscopy. *Metab Eng*, 12, 138–149.
- Griggs J., Zinkewich K. (2009). The state of the art: immune-mediated mechanisms of monoclonal antibodies in cancer therapy. *Br J Cancer*, 101, 1807–1812.
- Guile G.R., Rudd P.M., Wing D.R., Prime S.B., Dwek R.A. (1996). A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal Biochem*, 240, 210–226.
- Harris R.J., Kabakoff B., Macchi F.D., Shen F.J., Kwong M., Andya J.D., Shire S.J., Bjork N., Totpal K., Chen A.B. (2001). Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *J Chromatogr B*, 752, 233–245.

- Hayter P.M, Curling E.M.A, Gould M.L., Baines A.J., Jenkins N., Salmon I, Strange P.G, Bull A.T. (1993). The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon- γ production in glucose-limited chemostat culture. *Biotechnol Bioeng*, 42, 1077-1085.
- Hernández V., Palomares L.A., Pastor R. (2015). Determinación del perfil de N-glicosilación en proteínas por HPLC fase normal. Procedimiento Interno. IBT UNAM.
- Hills A.E., Patel A, Boyd P, James D.C. (2001). metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnol Bioeng*, 75, 2, 239-251.
- Hodoniczky J., Zheng Y.Z., James D.C. (2005). Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-Glycan remodeling *in vitro*. *Biotechnol, Prog*, 21, 1644-1652.
- Hossler P., Wang M., McDermott S., Racicot C., Chemfe K., Zhang Y., Chumsae C., Manuilov A. (2015). Cell culture media supplementation of bioflavonoids for the targeted reduction of acidic species charge variants on recombinant therapeutic proteins. *Biotechnol*, 31, 4, 1039-1052.
- Houde D., Peng Y., Berkowitz S.A., Engen J.R. (2010). Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteom*, 9.8, 1716-1728
- Ivarsson M., Villiger T.K., Morbidelli M., Soos M. (2014). Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. *J Biotechnol*, 188, 88–96.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M. (2012). *Immunobiology*. Estados unidos: Garland Science.
- Jefferis R. (2009). Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 7, 356-362.
- Kai-Ting C.S., Anthony R.M. (2013). Antibody glycosylation and inflammation. *Antibodies*, 2, 392-414.
- Khawli L., Goswami S., Hutchinson R., Kwong Z., Yang J., Wang X., Yao Z., Sreedhara A., Cano T., Tesar D., Nijem I., Allison E., Wong P., Kao Y., Quan C., Joshi A., Harris R., Motchnik P. (2010). Charge variants in IgG1. *MAbs*, 2:6, 613-624.
- Kunkel J.P., Jan D.C., Butler M, Jamieson J.C. (2000). Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different biorreactors. *Biotechnol*, 16, 462-470.
- Li W.W., Liu, S.J., Chen Y., Zheng C., Qi N. (2013). Effects of the dilution rate on cell cycle distribution and PEI-mediated transient gene expression by CHO cells in continuous culture. *Process Biochem*, 48, 1572–1580.
- Lipscomb M., Palomares L.A., Hernández V., Ramírez O.T., Kompala S. (2005). Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnol*, 21, 40-49.
- Liu H., Gaza-Bulseco G., Faldu D., Chumsae C., Sun J. (2008). heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci*, 97, 7, 2426-2447.
- Liu L., (2015). Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-Fusion proteins. *J Pharm Sci*, 104, 1866–1884.
- Liu L. (2018). Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell*, 9, 1, 15–32
- Liu Y.D., Goetze A.M., Bass R.B., Flynn G.C. (2011). N-terminal glutamate to pyroglutamate conversion *in vivo* for human IgG2 antibodies. *J Biol Chem*, 286, 13, 11211–11217.
- Lu S., Sun X., Zhang Y. (2005). Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. *Process Biochem*, 40, 1917–1921.

- Malhotra R., Wormald M.R., Rudd P.M., Fischer P.B., Dwek R.A., Sim R.B. (1995). Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Med*, 1, 3, 237-243.
- Mathews, Van Hole, Ahern. (2003). *Bioquímica. España: Addison Wesley.*
- Miao S., Xie P., Zou M., Fan L., Liu X., Zhou Y., Zhao L., Ding D., Wang H., Tan W.S. (2017). Identification of multiple sources of the acidic charge variants in an IgG1 monoclonal antibody. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101, 5627–5638.
- Min S., Hyoung J., Sin M., Won J., Min G. (2016). Reduction of ammonia and lactate through the coupling of glutamine synthetase selection and down regulation of lactate dehydrogenase-A in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1-11.
- Mimura Y., Kato T, Saldova R., O’Flaherty R, Izumi T., Mimura-Kimura Y., Utsunomiya T, Mizukami Y., Yamamoto K, Matsumoto T., Rudd P.M. (2018). Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell*, 9, 1, 47–62.
- Mo J., Jin R., Yan Q., Sokolowska I., Lewis M.J., Hu P. (2018). Quantitative analysis of glycation and its impact on antigen binding. *MAbs*, 10, 3, 406–415.
- Montgomery D.C., Runger G.C. (2003). *Applied statistics and probability for engineers.* Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Naderi S., Meshram M., Wei C., McConkey B., Ingalls B., Budman H., Sharer J. (2010). Metabolic flux and nutrient uptake modeling of normal and apoptotic CHO cells. *Int Symp Comp App Biotechnol*, 12, 395-400.
- NCBI. (2018). Immunoglobulin lambda heavy chain [Homo sapiens]. de NCBI Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA75032.1>
- NCBI. (2018). Ig lambda chain (Kol) - human. de NCBI Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/S03401>
- Nicolae A., Wahrheit J., Bahnemann J., Zeng A.P., Heinzle E. (2014). Non-stationary ¹³C metabolic flux analysis of Chinese hamster ovary cells in batch culture using extracellular labeling highlights metabolic reversibility and compartmentation. *BMC Syst Biol*, 8, 50, 1-15.
- Omasa T., Furuichi K., Iemura T., Katakura Y., Kishimoto M., Suga K. (2010). Enhanced antibody production following intermediate addition based on flux analysis in mammalian cell continuous culture. *Bioprocess Biosyst Eng*, 33, 117–125.
- Ozturk S. (1996). Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnology*, 22, 3-16.
- Pabst M., Palmgren R., Forss A., Vasic J., Fonseca M., Thompson C., Wang W., Wang X, Hunter A., (2014). Engineering of novel Staphylococcal protein A ligands to enable milder elution pH and high dynamic binding capacity. *J Chromatogr A*, 1312, 180-185.
- Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramírez O.T. (2004). Production of recombinant proteins. *Methods Mol Biol*, 267, 15-51.
- Palomares L.A., Ramírez O.T. (2007). Glicosilación de proteínas recombinantes: importancia y relación con las condiciones de bioproceso. En *diseño y producción de fármacos (95-123)*. México: El Colegio Nacional.
- Perdivara I., Deterding L.J., Cozma C., Tomer K.B., Przybylski M. (2009). Glycosylation profiles of epitope-specific anti- β -amyloid antibodies revealed by liquid chromatography–mass spectrometry. *Glycobiology*, 19, 9, 958–970.
- Prigge S.T., Main R.E., Eipper B.A., Amzel L.M. (2000). New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1236–1259.

- Ramírez O.T., Mutharasan R. (1990). Cell cycle and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng*, 36, 839-848.
- Robinson D.K., Memmert K.W. (1991). Kinetics of recombinant immunoglobulin production by mammalian cells in continuous culture. *Biotechnol Bioeng*, 38, 972-976.
- Robinson N.E., Robinson A.B. (2001). Molecular clocks. *PNAS*, 98, 3, 944–949.
- Rogers L.M., Veeramani S., Weiner G.J. (2014). Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Immunol Res*, 59, 203-210.
- Serrato J. A., Palomares L.A., Meneses-Acosta A., Ramírez O.T. (2004). Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-Glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng*, 88, 176-188.
- Sellick C.A, Croxford A.S., Maqsood A.R., Stephens G, Westerhoff H.V., Goodacre R., Dickson A.J. (2011). Metabolite profiling of recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 108, 12, 3025-3031.
- Schmelzer A., Miller W. (2000). Effects of osmoprotectant compounds on NCAM polysialylation under hyperosmotic stress and elevated pCO₂. *Biotechnol Bioeng*, 77, 359-368.
- Scott M., Davis J., Schwartz K. (1997). Staphylococcal protein A binding to canine IgG and IgM. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 59, 2015-2012.
- Sha S., Agarabi C., Brorson K, Lee D.Y., Yoon S. (2016). N-glycosylation design and control of therapeutic monoclonal antibodies. *Trends Biotechnol*, 34, 835-846.
- Shahrokh Z., Eberlein G., Buckley D., Paranandi M.V., Aswad D.W., Stratton P., Mischak R., Wang Y.J. (1994). Major degradation products of basic fibroblast growth factor: detection of succinimide and iso-aspartate in place of aspartate. *Pharm Res*, 11, 7, 936-944.
- Shi H.H, Goudar C.T. (2014). Recent advances in the understanding of biological implications and modulation methodologies of monoclonal antibody N-linked high mannose glycans. *Biotechnol Bioeng*, 11, 1907-1919.
- Slade P.G., Caspary R.G., Nargund S., Huang C. (2016). mannose metabolism in recombinant CHO cells and its effect on IgG glycosylation. *Biotechnol Bioeng*, 113, 7, 1468-1480.
- Sou S.N., Sellick C., Lee K., Mason A., Kyriakopoulos S., Polizzi K.M., Kontoravdi C. (2015). How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation?. *Biotechnol Bioeng*, 112, 6, 1165-1176.
- Tang H., Miao S., Zhang X., Fan L., Liu X., Tan W.S. (2018). Insights into the generation of monoclonal antibody acidic charge variants during Chinese hamster ovary cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102, 1203–1214.
- Thermo Scientific. (2011). Pierce® Protein A Columns. Mayo 20, 2017, de Thermofisher Sitio web: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011293_Pierce_ProteinA_Column_UG.pdf
- ThermoFischer Scientific. (s.f.). Immunoglobulin structure and classes. Mayo 21, 2017, de ThermoFischer Scientific Sitio web: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/immunoglobulin-structure-classes.html#structure>
- Torkashvand F., Vaziri B. (2017). Main Quality Attributes of monoclonal antibodies and effect of cell culture components. *Iran Biomed*, 21, 3, 131-141.
- Urbas L., Brne P., Gabor B., Plevcak S., Barut M. (2008). Rapid human polyclonal IgG quantification using the agilent bio-monolith protein A HPLC column. Octubre 25, 2016., de Agilent Sitio web: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-9733EN.pdf>

- Vallez-Chetreau F. (2006). Tesis de Doctorado: Characterization of the mechanism of action of spin-filters for animal cell perfusion cultures. Suiza.
- Varki J., Cummings R., Esko J., Freeze H., Stanley P., Bertozzi C., Hart G., Etzler M. (2009). *Essentials of glycobiology*. Estados Unidos: Cold Spring Harbor.
- Varki J., Cummings R., Esko J., Stanley P., Hart G., et al. (2017). *Essentials of glycobiology*. Estados Unidos: Cold Spring Harbor.
- Vergara M., Becerra S., Berrios J., Osses N., Reyes J., Rodríguez-Moya M, Gonzalez R., Altamirano C. (2014). Differential effect of culture temperature and specific growth rate on CHO cell behavior in chemostat culture. *PLoS One*, 9, 1-6.
- Voet D., Voet J. (2006). *Bioquímica*. Argentina: Panamericana.
- Wacker C., Berger C.N., Girard P., Meier R. (2011). Glycosylation profiles of therapeutic antibody pharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*, 79, 503–507.
- Wang X, An Z, Luo W, Xia N, Zhao Q. (2018). Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell*, 9, 1, 74–85.
- Xie P., Niu H., Chen X., Zhang X., Miao S., Deng X., Liu X., Tan W.S. Zhou Y., Fan L. (2016). Elucidating the effects of pH shift on IgG1 monoclonal antibody acidic charge variant levels in Chinese hamster ovary cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 10343–10353.
- Yang M., Butler M. (2000). Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol*, 16, 751-759.
- YSI. (2016). YSI 2900 Series biochemistry analyzers operations and maintenance manual. Octubre 25, 2016, de YSI Sitio web: <https://www.yei.com/File%20Library/Documents/Manuals/YSI-2900-series-manual.pdf>
- Zhou H., Mascelli M.A. (2011). Mechanisms of monoclonal antibody–drug interactions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51,1, 359-372.

12 ANEXOS

12.1 Cultivo tipo lote

12.1.1 Cinéticas de crecimiento

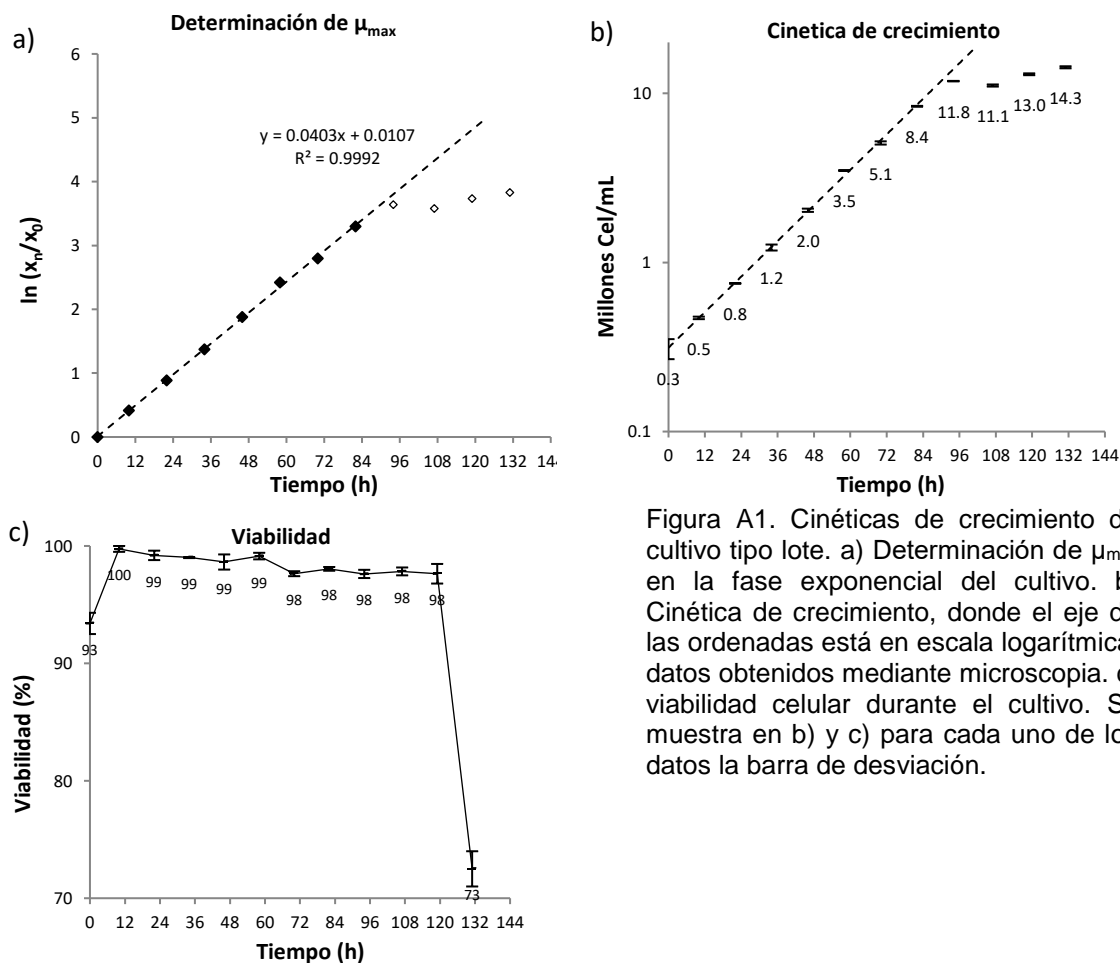


Figura A1. Cinéticas de crecimiento de cultivo tipo lote. a) Determinación de μ_{max} en la fase exponencial del cultivo. b) Cinética de crecimiento, donde el eje de las ordenadas está en escala logarítmica, datos obtenidos mediante microscopia. c) viabilidad celular durante el cultivo. Se muestra en b) y c) para cada uno de los datos la barra de desviación.

En la Figura A1 se muestran las cinéticas de crecimiento de cultivo tipo lote, el cual fue realizado por duplicado. Se puede observar el comportamiento del crecimiento celular en los cultivos tipo lote realizados en matraz Erlenmeyer. Se determinó una velocidad máxima de crecimiento μ_{max} de $0.040 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$. Se tuvo una concentración celular máxima de $1.43 \times 10^7 \text{ cel/mL}$ a las 131 horas, acompañada de un descenso en la viabilidad celular.

12.1.2 Metabolismo

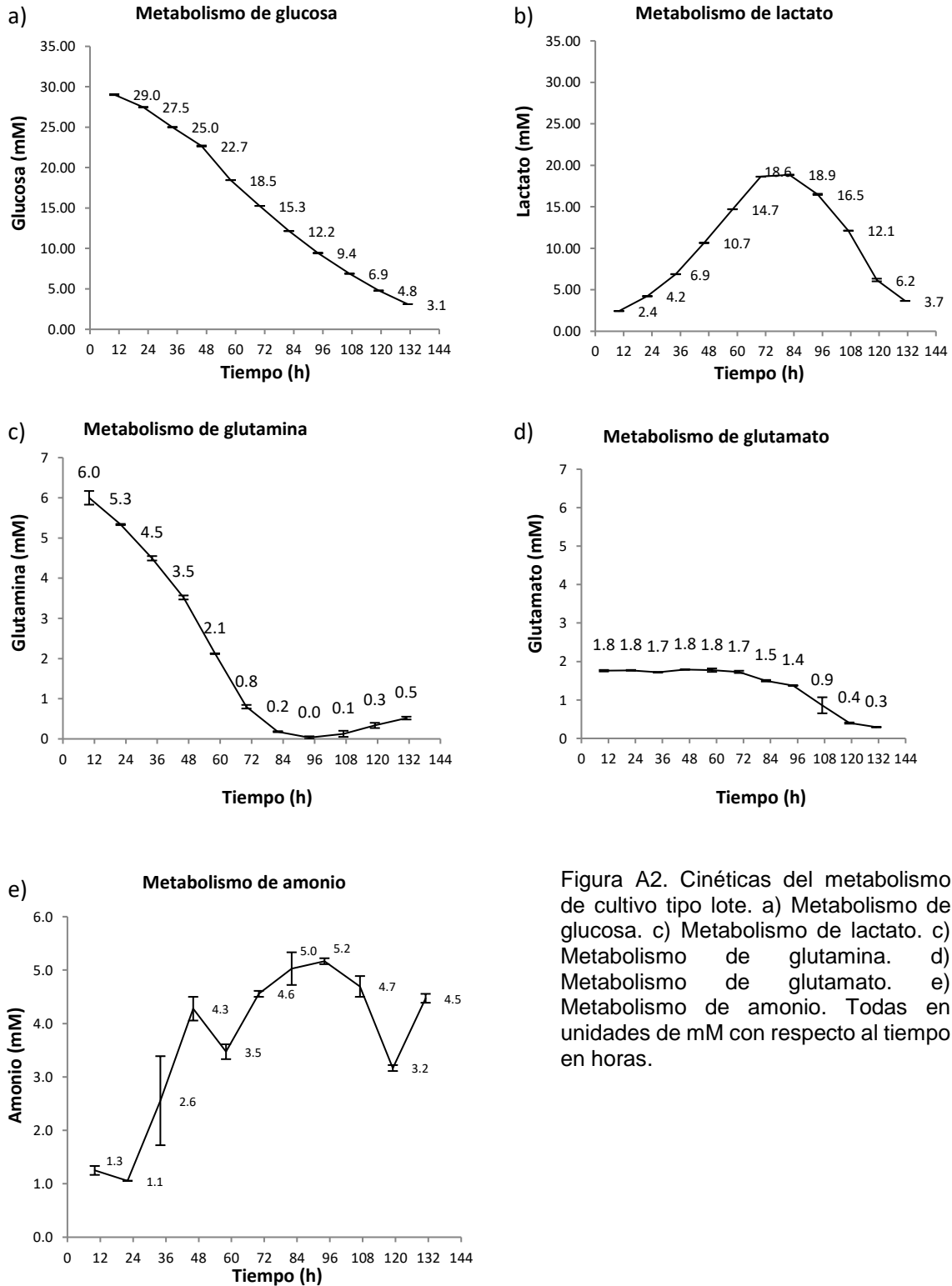


Figura A2. Cinéticas del metabolismo de cultivo tipo lote. a) Metabolismo de glucosa. c) Metabolismo de lactato. c) Metabolismo de glutamina. d) Metabolismo de glutamato. e) Metabolismo de amonio. Todas en unidades de mM con respecto al tiempo en horas.

En la Figura A2 se muestra el comportamiento cinético de los distintos nutrientes y metabolitos estudiados en el cultivo tipo lote. En la primera etapa del cultivo (fase exponencial) se observó un consumo de glutamina y glucosa, una concentración de glutamato constante y producción de amonio y lactato. Se tuvo con un cambio en el comportamiento metabólico posterior a las 70 horas (inicio de fase estacionaria), donde se observó un consumo de glutamato, producción de glutamina y consumo de lactato.

En la Tabla A1 se muestran las velocidades de consumo/generación de nutrientes y metabolitos. Donde las velocidades con signo negativo indican consumo y los valores con signo positivo, producción. Se estudiaron 2 matraces, que fueron identificados como Lote R1 y Lote R2. Para el cálculo de las constantes se utilizaron 5 intervalos correspondientes a la fase exponencial. Los cálculos se realizaron omitiendo el primer intervalo del cultivo ya que no se cuenta con la concentración inicial de los nutrientes del medio de cultivo. Se determinó el área bajo la curva para cada uno de los intervalos de muestreo correspondientes a la fase exponencial (10 a 70 horas). No se consideraron los tiempos posteriores a las 70 horas, ya que en el periodo entre 70 y 82 horas se observa una modificación en las tendencias de consumo de nutrientes.

Tabla A1. Velocidades específicas de consumo de nutrientes y de generación de metabolitos en cultivo tipo lote.

	Glucosa (fmol/cel·h)			Lactato (fmol/cel·h)			Amonio (fmol/cel·h)		
	Promedio	DE	CV %	Promedio	DE	CV %	Promedio	DE	CV %
Lote R1	-152	78	51	171	69	40	31	73	238
Lote R2	-139	53	38	172	74	43	43	87	204

	Glutamina (fmol/cel·h)			Glutamato (fmol/cel·h)		
	Promedio	DE	CV %	Promedio	DE	CV %
Lote R1	-61	34	56	-0.6	03.3	507
Lote R1	-51	19	36	0.4	03.8	944

En la Figura A3 se muestra el modelado del crecimiento celular en la fase exponencial. Este modelado permitió calcular de manera más exacta el área bajo la curva a lo largo de la fase exponencial. El área bajo la curva fue de utilidad para

determinar el consumo específico de medio de cultivo en la fase exponencial con un valor de 200 pL/cel·día. Este dato fue de utilidad para estimar el tiempo que un cultivo estaría en fase exponencial dependiendo de la concentración celular inicial.

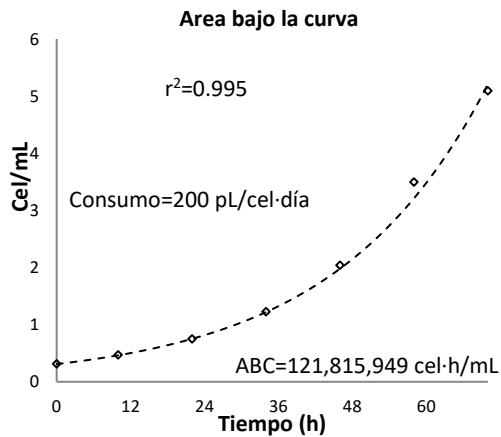
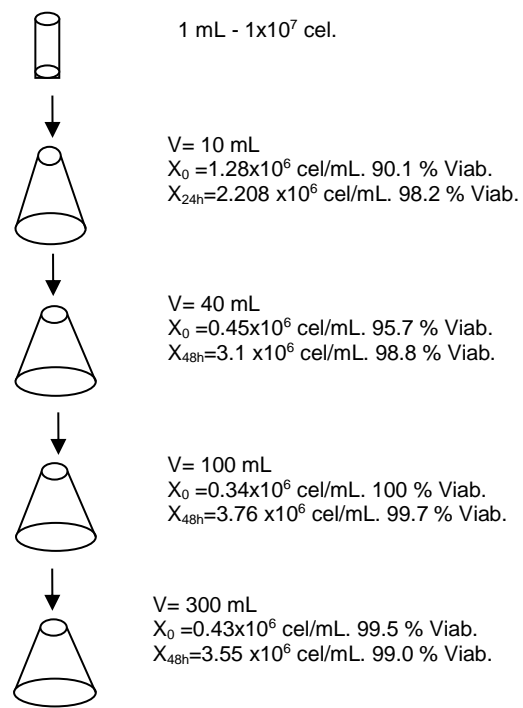


Figura A3. Descripción del modelo de crecimiento en fase exponencial. Se muestra la determinación del área bajo la curva de la fase exponencial. La línea punteada representa el modelo exponencial el cual se ajusta con un r^2 de 0.9983 con los datos experimentales (rombos).

12.2 Cultivo semicontinuo

12.2.1 Expansión celular e inicio de cultivo

En la Figura A4 se muestra el proceso de inicio de los cultivos semicontinuos. Se inició con el descongelado de un vial con la línea celular. Se continuó con la expansión celular donde se buscaba mantener a las células en fase exponencial hasta alcanzar la concentración celular objetivo de 5×10^6 cel/mL y 1×10^7 cel/mL. Se realizó en primera instancia una expansión celular iniciando con el inóculo del vial descongelado en un matraz de 10 mL con subsecuentes pases a matraces con mayor volumen cuidando iniciar con una concentración inicial mayor a 2×10^5 cel/mL. Una vez que se alcanzó un volumen de 300 mL se realizó un esquema de perfusión para retirar el medio gastado y adicionar medio nuevo. Se logró la concentración deseada de los matraces, matraz R1 60% μ_{max} y matraz R1 10% μ_{max} (Tabla A2). Fue necesario continuar con el esquema de perfusión en 2 ocasiones más para obtener una concentración celular inicial de 1×10^7 cel/mL en medio de cultivo fresco en matraces R2 60% μ_{max} y R2 10% μ_{max} , como se muestra en la Figura A4.



1 mL - 1×10^7 cel.

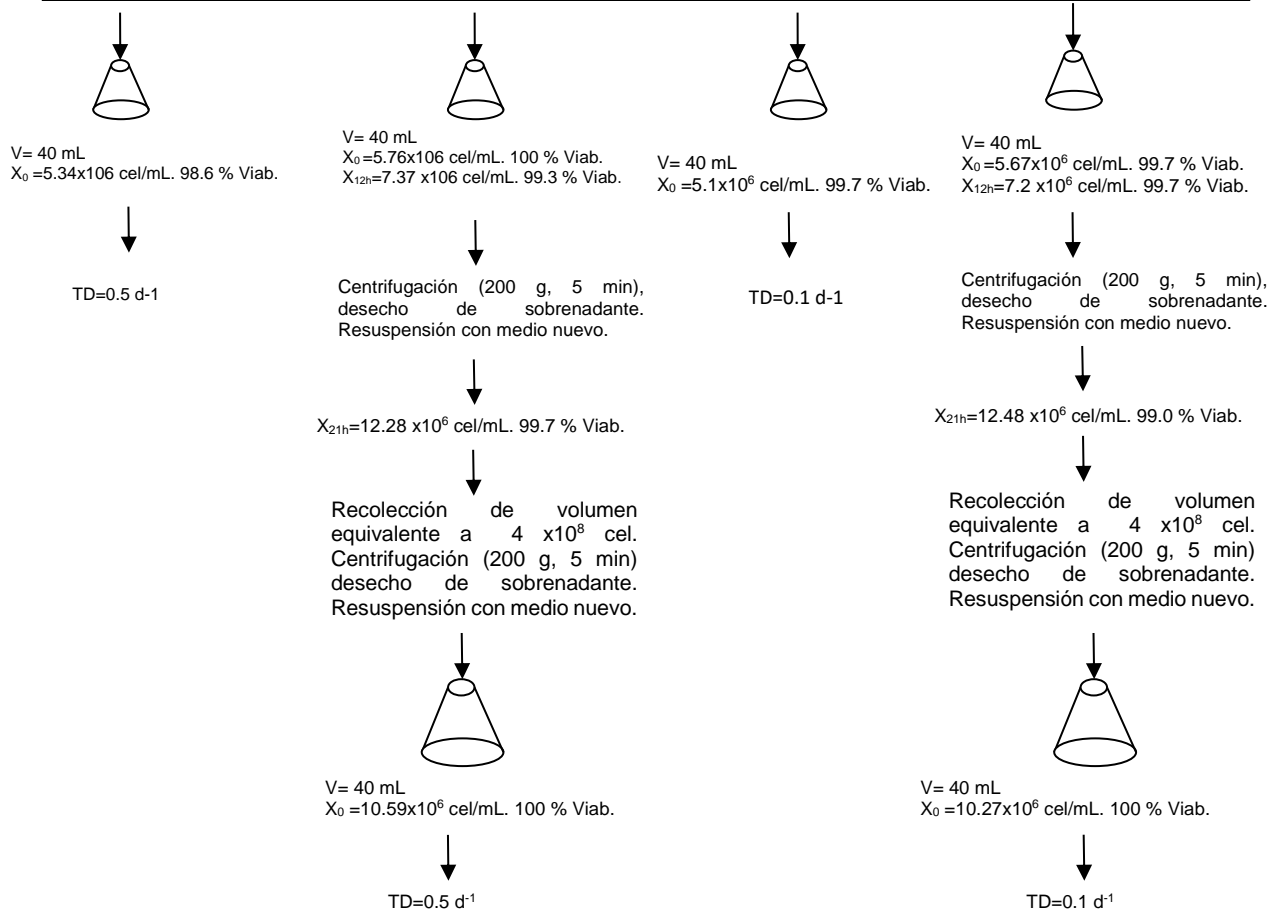
V= 10 mL
 $X_0 = 1.28 \times 10^6$ cel/mL. 90.1 % Viab.
 $X_{24h} = 2.208 \times 10^6$ cel/mL. 98.2 % Viab.

V= 40 mL
 $X_0 = 0.45 \times 10^6$ cel/mL. 95.7 % Viab.
 $X_{48h} = 3.1 \times 10^6$ cel/mL. 98.8 % Viab.

V= 100 mL
 $X_0 = 0.34 \times 10^6$ cel/mL. 100 % Viab.
 $X_{48h} = 3.76 \times 10^6$ cel/mL. 99.7 % Viab.

V= 300 mL
 $X_0 = 0.43 \times 10^6$ cel/mL. 99.5 % Viab.
 $X_{48h} = 3.55 \times 10^6$ cel/mL. 99.0 % Viab.

En 8 tubos se colocó el volumen equivalente a 1×10^8 cel. en cada uno de ellos. Fueron centrifugados a 200 g por 5 minutos, se separó el sobrenadante. Se resuspendió cada tubo con 20 mL de medio fresco, agregándose el contenido de 2 tubos a cada matraz (40 mL, 200×10^8 cel.).



V= 40 mL
 $X_0 = 5.34 \times 10^6$ cel/mL. 98.6 % Viab.

TD=0.5 d-1

V= 40 mL
 $X_0 = 5.76 \times 10^6$ cel/mL. 100 % Viab.
 $X_{12h} = 7.37 \times 10^6$ cel/mL. 99.3 % Viab.

$X_{21h} = 12.28 \times 10^6$ cel/mL. 99.7 % Viab.

Recolección de volumen equivalente a 4×10^8 cel. Centrifugación (200 g, 5 min) desecho de sobrenadante. Resuspensión con medio nuevo.

V= 40 mL
 $X_0 = 10.59 \times 10^6$ cel/mL. 100 % Viab.

TD=0.5 d⁻¹

V= 40 mL
 $X_0 = 5.1 \times 10^6$ cel/mL. 99.7 % Viab.

TD=0.1 d-1

V= 40 mL
 $X_0 = 5.67 \times 10^6$ cel/mL. 99.7 % Viab.
 $X_{12h} = 7.2 \times 10^6$ cel/mL. 99.7 % Viab.

$X_{21h} = 12.48 \times 10^6$ cel/mL. 99.0 % Viab.

Recolección de volumen equivalente a 4×10^8 cel. Centrifugación (200 g, 5 min) desecho de sobrenadante. Resuspensión con medio nuevo.

V= 40 mL
 $X_0 = 10.27 \times 10^6$ cel/mL. 100 % Viab.

TD=0.1 d⁻¹

Figura A4. Esquema del proceso de inicio del cultivo semicontinuo. Se muestran las etapas realizadas desde el descongelado del inoculo, la expansión celular, hasta llegar a la concentración celular en los distintos matraces para dar inicio al esquema de recambio de medio de cultivo.

Tabla A2. Matriz experimental del cultivo semicontinuo.

Muestra	Concentración celular inicial (cel/mL)	Tasa de dilución (d ⁻¹)
Matraz R1 60% μ_{\max}	5x10 ⁶	0.5
Matraz R2 60% μ_{\max}	10x10 ⁶	0.5
Matraz R1 10% μ_{\max}	5x10 ⁶	0.1
Matraz R2 10% μ_{\max}	10x10 ⁶	0.1

12.2.2 Cinética de crecimiento

En la Figura A5 se muestra la cinética de concentración celular y viabilidad a lo largo de 35 días de cultivo semicontinuo. Los matraces R1 60% μ_{\max} y matraz R1 10% μ_{\max} fueron iniciados con una concentración celular de 5 millones de cel/mL. Los matraces R2 60% μ_{\max} y matraz R2 10% μ_{\max} fueron iniciados con 10 millones de cel/mL. Se utilizó una tasa de dilución de 0.5 d⁻¹ para los matraces R1 y R2 60% μ_{\max} y de 0.1 d⁻¹ para los matraces R1 y R2 10% μ_{\max} . Las tasas de dilución de 0.1 d⁻¹ alcanzaron altas concentraciones celulares ya que las células continuaron en la fase exponencial, alcanzando una concentración máxima de 2.32x10⁷ cel/mL en el matraz R2 10% μ_{\max} . Esto fue ocasionado por la disponibilidad de nutrientes y baja extracción celular. Sin embargo, después de llegar a la máxima concentración celular se tuvo un agotamiento de nutrientes (Figura A7) (glucosa, glutamina, glutamato y lactato). Por consiguiente, se tuvo una reducción drástica de la viabilidad celular alcanzándose valores de 2% con concentraciones de células vivas de 0.3x10⁶ cel/mL. Durante el transcurso de los recambios de medio de cultivo incrementó la viabilidad y concentración celular. Se alcanzaron valores promedios de 42% de viabilidad con 3.3x10⁶ cel/mL vivas en la fase pseudo-estable del cultivo (13 a 34 días).

Por otro lado, los matraces que operaron a una tasa de dilución de 0.5 d⁻¹, alcanzaron una concentración celular máxima de 1.7x10⁷ cel/mL. Además, tuvieron una viabilidad mínima del 96% a lo largo de todo el cultivo. También, tuvieron una concentración celular promedio en la fase estable de 8.5x10⁶ cel/mL para ambos matraces. A pesar de que para cada tasa de dilución se inició con dos

concentraciones celulares distintas, durante el transcurso del cultivo y recambios los parámetros determinados en los cultivos de la misma tasa de dilución fueron igualándose. Lo que nos indica que el factor determinante de la cinética de crecimiento y metabolismo es la tasa de dilución (que influye sobre el ingreso de nutrientes y extracción de metabolitos y células).

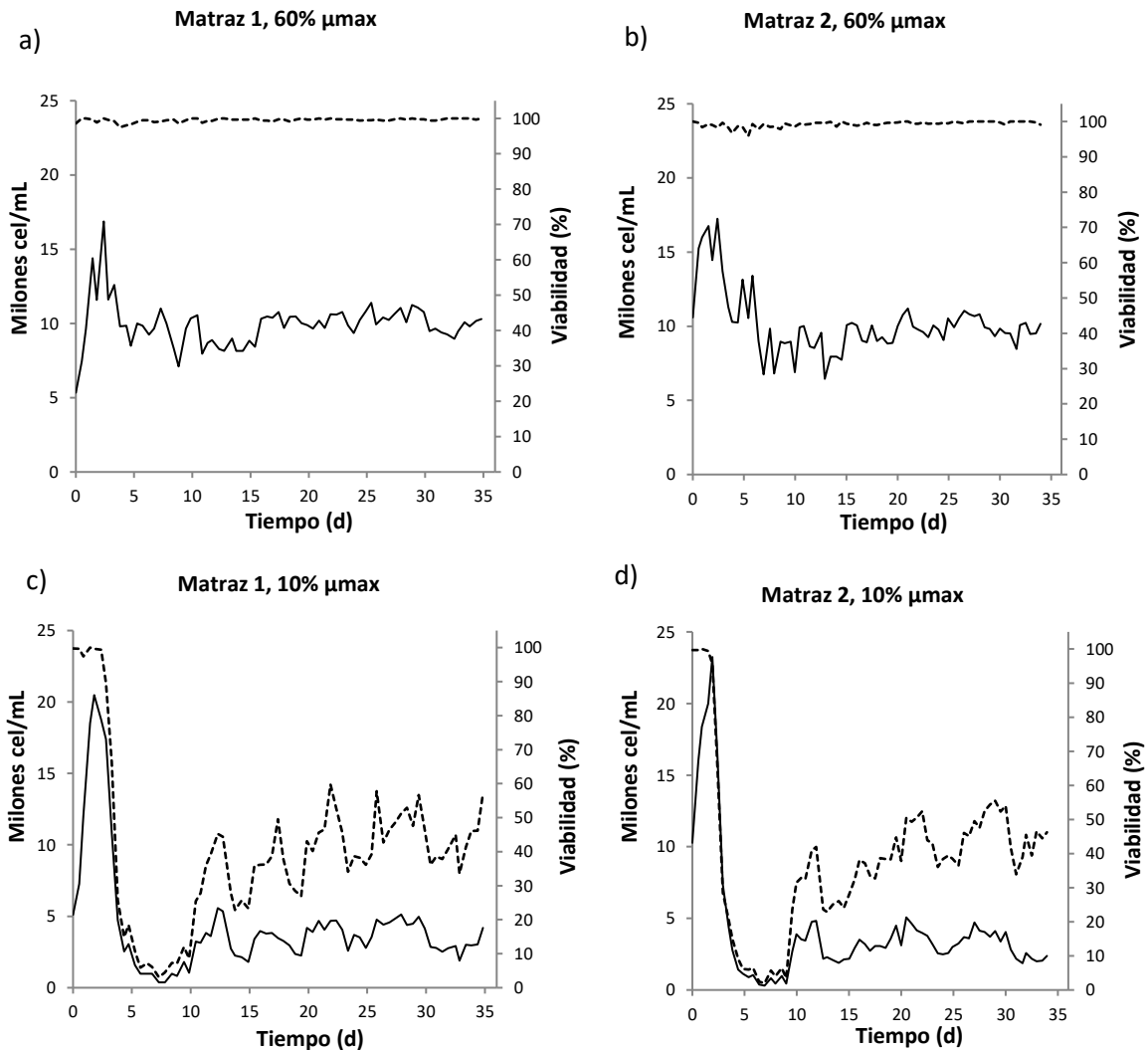


Figura A5. Cinéticas de crecimiento de cultivo semicontinuo. a) Matraz R1 60% μ_{max} , b) matraz R2 60% μ_{max} , c) matraz R1 10% μ_{max} y d) matraz R2 10% μ_{max} . En el eje primario de las ordenadas (izquierda) se muestra la escala de la concentración celular en millones de cel/mL correspondiendo a la línea sólida. En el eje secundario de las ordenadas (derecha) línea punteada muestra el porcentaje de viabilidad.

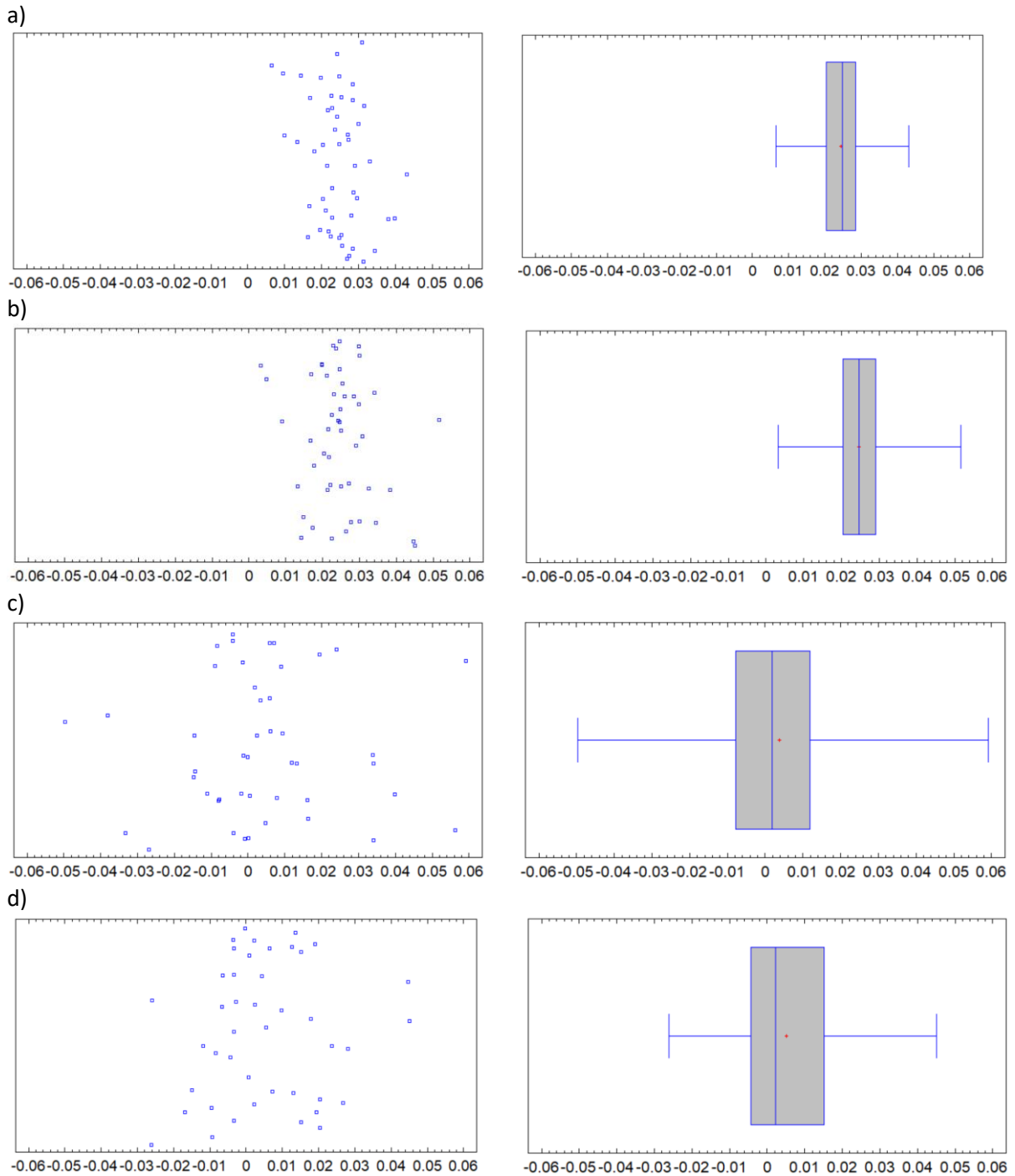


Figura A6. Análisis de velocidades específicas de crecimiento en cultivos semicontinuos. Se muestra la velocidad específica de crecimiento de los cultivos continuos de los matraces R1 y R2 60% μ_{\max} y matraces R1 y R2 10% μ_{\max} en los diagramas a), b), c) y d) respectivamente. Las velocidades de crecimiento del análisis están en h^{-1} . Los diagramas fueron construidos utilizando los datos de la fase pseudo-estable. A la izquierda se muestra la dispersión de las velocidades específicas de crecimiento y a la derecha en el diagrama de caja y bigotes se representa la distribución por cuartiles de los datos. Las 4 líneas verticales del diagrama representan la separación entre los cuartiles (cada

cuartil representa el 25% de datos ordenados en orden ascendente). La línea central de la caja representa la mediana y el punto dentro de la caja representa el promedio.

En este estudio de cultivos semicontinuos se buscó observar la influencia de la tasa de dilución sobre la velocidad específica de crecimiento. Se tomó como referencia el concepto que $D=\mu$, por lo que teóricamente se esperaban velocidades específicas de crecimiento de 0.020 h^{-1} ($D = 0.5 \text{ d}^{-1}$) y de 0.004 h^{-1} ($D = 0.1 \text{ d}^{-1}$). En otras palabras, convirtiendo a valores de μ_{\max} se esperaban valores de μ_{\max} del 50% y 10% respectivamente.

Como apoyo para la interpretación de la Figura A6 se construyó la Tabla A3, en la cual se observan los valores mínimos, cuartil inferior, cuartil superior y máximo obtenidos. Es interesante observar que en R1 y R2 de matraces 60% μ_{\max} , el 50% de los datos (situados entre cuartil inferior y superior) se encuentran entre 0.020 y 0.029 para ambos estudios donde estos valores son muy cercanos a la tasa de dilución. Por otro lado, para los cultivos R1 y R2 matraces 10% μ_{\max} se obtuvieron velocidades específicas de crecimiento muy dispersas teniendo desde valores negativos de -0.049 h^{-1} hasta positivos de 0.059 h^{-1} . Esta alta variabilidad es dada porque se está calculando una μ aparente que engloba tanto la velocidad de muerte como la de crecimiento. Además, es de considerando que, a esta tasa de dilución en muchos puntos se tuvo limitación de nutrientes (en específico se identificó limitación de glucosa). Lo cual se relacionó con la baja viabilidad celular. Sin embargo, el 50% de los valores determinados de μ se encuentran cercanos a la velocidad específica de crecimiento de 0.004 h^{-1} que es equivalente a la tasa de dilución utilizada (0.1 d^{-1}).

Tabla A3. Distribución de velocidad específica de crecimiento en cultivo semicontinuo.

Muestra	Mínimo	Cuartil inferior	Cuartil superior	Máximo	Promedio
Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})					
Matraz R1 60% μ_{max}	0.006	0.020	0.028	0.043	0.024
Matraz R2 60% μ_{max}	0.003	0.020	0.029	0.051	0.024
Matraz R1 10% μ_{max}	-0.049	-0.007	0.011	0.059	0.004
Matraz R2 10% μ_{max}	-0.026	-0.004	0.015	0.045	0.005

12.2.3 Metabolismo

En la Tabla A4 se muestra la concentración de nutrientes y metabolitos estudiados en el medio fresco.

Tabla A4. Concentraciones de nutrientes/metabolitos en medio de cultivo fresco.

Nutriente/Metabolito	mM	g/L
Glucosa	33.3	6.00
Glutamina	6.0	0.88
Glutamato	1.56	0.23
Lactosa	0.0	0.00
Amonio	0.0	0.00

En la Tabla A5 se muestra las velocidades específicas de consumo de nutrientes y de generación de metabolitos. Para los estudios realizados en cultivo tipo lote se estudiaron 2 matraces que fueron identificados como Lote R1 y Lote R2. Para el cálculo de las constantes se utilizaron 5 intervalos correspondientes a la fase exponencial. Por otro lado, para los cultivos semicontinuos matraces R1 y R2 60% μ_{max} y matraces R1 y R2 10% μ_{max} se utilizaron los datos obtenidos en la fase pseudo-estable del cultivo. DE indica la desviación estándar y CV el coeficiente de variación. Se observan valores mayores en el consumo de nutrientes y generación de metabolitos en los cultivos tipo lote que en los cultivos semicontinuos. Sin embargo, el consumo de glutamato es la excepción. El cual es consumido en cultivo tipo lote y matraz 60% μ_{max} , y por el contrario producido en matraz 10% μ_{max} .

Tabla A5. Velocidades específicas de consumo de nutrientes y de generación de metabolitos, para cultivos tipo lote y cultivo semicontinuo.

	q Glucosa (fmol/cel·h)			q Lactato (fmol/cel·h)			q Amonio (fmol/cel·h)		
	Promedio	DE	CV %	Promedio	DE	CV %	Promedio	DE	CV %
Lote R1	-152	78	-51	171	69	40	31	73	238
Lote R2	-139	53	-38	172	74	43	43	87	204
R1 60% μ_{max}	-55	8	-15	27	13	48	9	10	111
R2 60% μ_{max}	-57	10	-17	27	15	55	9	9	97
R1 10% μ_{max}	-42	14	-33	5	14	294	9	20	233
R2 10% μ_{max}	-49	17	-35	9	18	213	11	27	235

	q Glutamina (fmol/cel·h)			q Glutamato (fmol/cel·h)		
	Promedio	DE	CV %	Promedio	DE	CV %
Lote R1	-61	34	-56	-0.646	3	-507
Lote R2	-51	19	-36	0.408	4	944
R1 60% μ_{max}	-14	2	-13	-0.483	1	-172
R2 60% μ_{max}	-14	2	-16	-0.426	1	-166
R1 10% μ_{max}	-8	5	-63	2.326	3	136
R2 10% μ_{max}	-9	3	-39	2.718	4	157

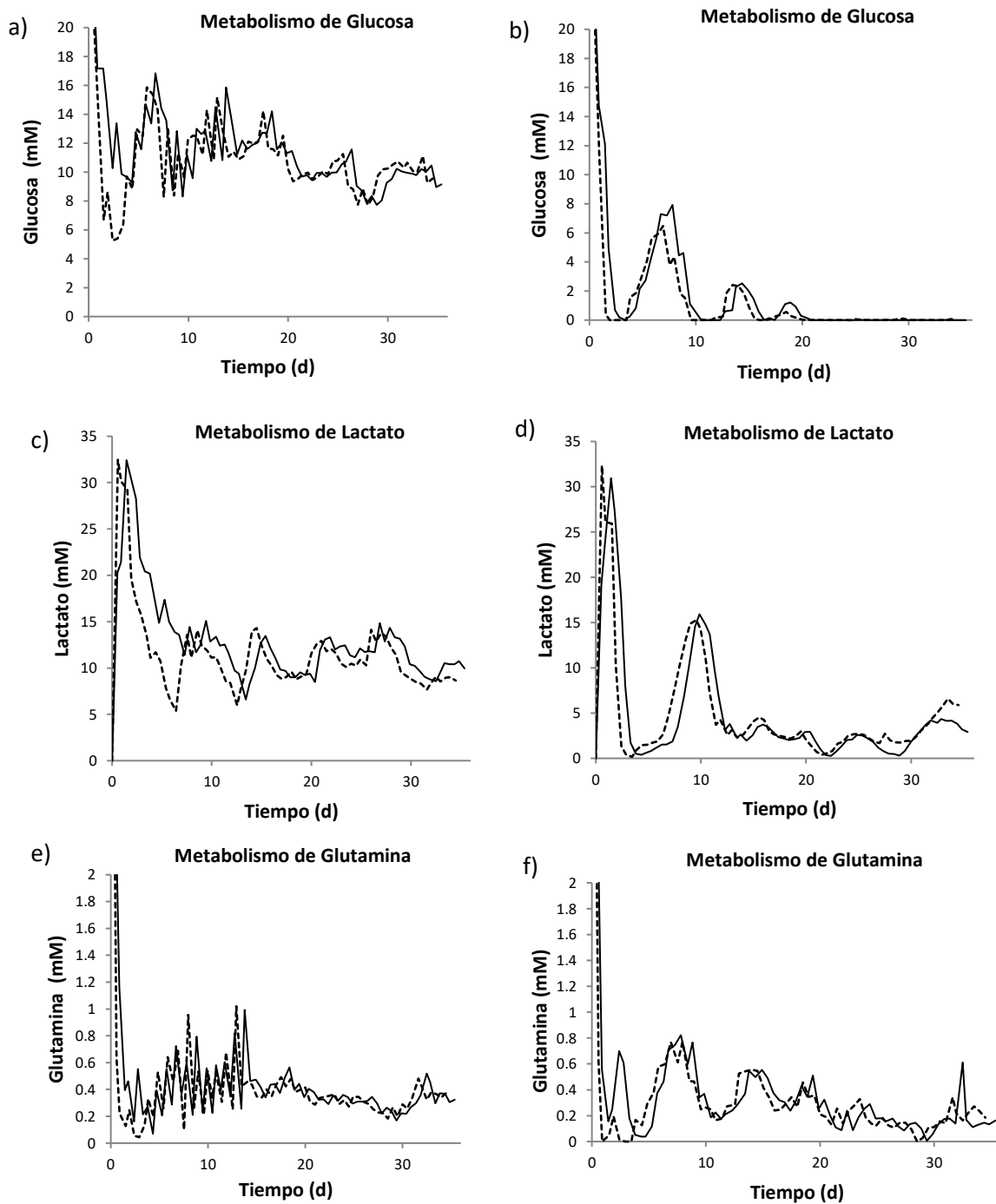


Figura A7. Cinéticas del metabolismo de cultivos semicontinuos. Se muestran las cinéticas del consumo de nutrientes y generación de metabolitos (a) y b) glucosa, c) y d) lactato, e) y f) glutamina, g) y h) glutamato, j) y k) amonio. La línea sólida representa los matraces R1 60% μ_{max} y 10% μ_{max} que iniciaron con 5 millones de cel/mL. La línea punteada representa los matraces R2 60% μ_{max} y 10% μ_{max} que iniciaron con 10 millones de cel/mL. Los gráficos de la izquierda corresponden a los cultivos en matraz 60% μ_{max} y los gráficos de la derecha a los cultivos en matraz 10% μ_{max} .

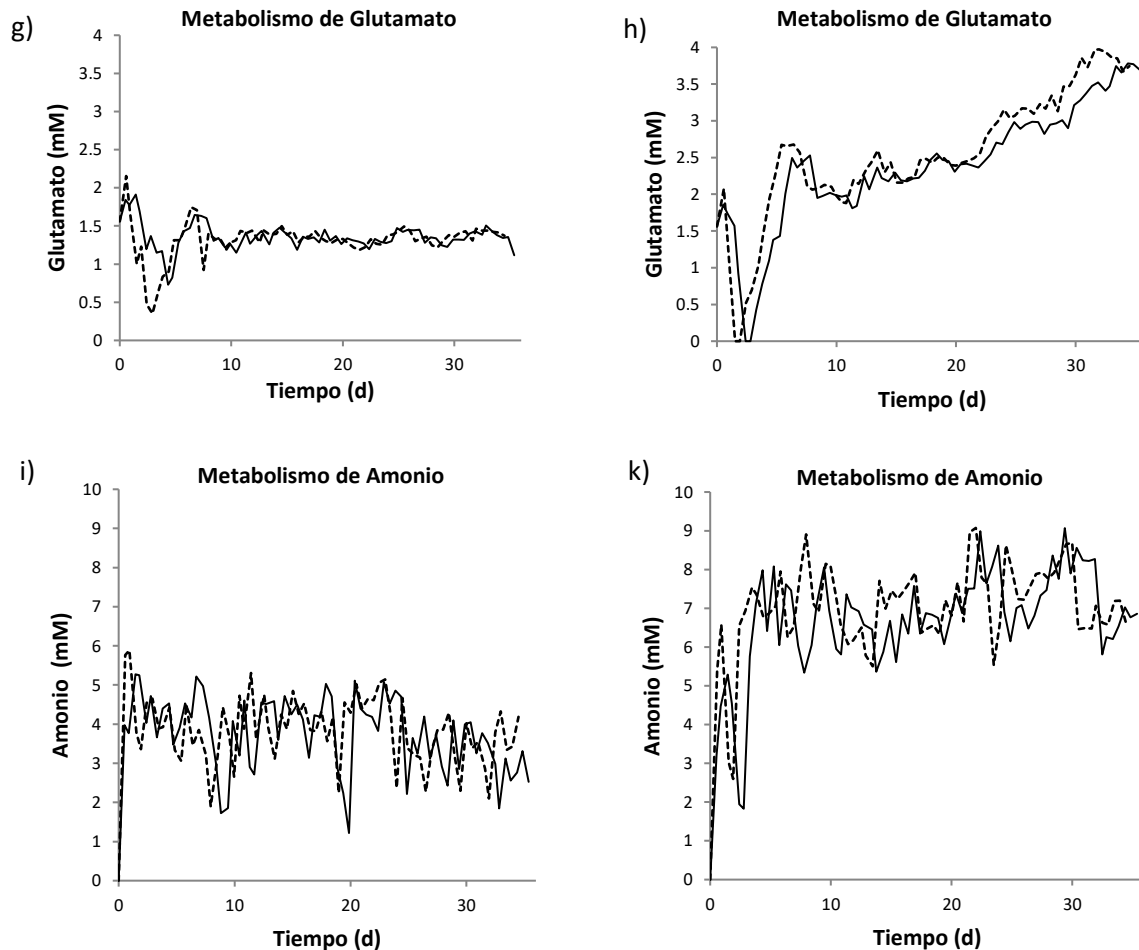


Figura A7. (Continuación). Cinéticas del metabolismo de cultivos semicontinuos. Se muestran las cinéticas del consumo de nutrientes y generación de metabolitos (a) y b) glucosa, c) y d) lactato, e) y f) glutamina, g) y h) glutamato, j) y k) amonio. La línea sólida representa los matraces R1 60% μ_{max} y 10% μ_{max} que iniciaron con 5 millones de cel/mL. La línea punteada representa los matraces R2 60% μ_{max} y 10% μ_{max} que iniciaron con 10 millones de cel/mL. Los gráficos de la izquierda corresponden a los cultivos en matraz 60% μ_{max} y los gráficos de la derecha a los cultivos en matraz 10% μ_{max} .

En la Figura A7 de cinéticas del metabolismo de cultivos semicontinuos, se puede observar la similitud entre los cultivos que fueron estudiados a la misma tasa de dilución. A pesar de haber iniciado a diferentes concentraciones celulares, estos alcanzaron un equilibrio a los pocos días. Se observa un desfase inicial entre cinéticas en la misma gráfica, es decir entre las líneas punteadas y discontinuas. Los cultivos a la tasa de dilución de 0.1 d^{-1} (10% μ_{max}) tuvieron un agotamiento inicial de nutrientes al inicio del cultivo por la alta concentración celular y baja tasa de dilución. El que inició con 10 millones de cel/mL (líneas punteadas) alcanzó el agotamiento de nutrientes antes que el que inició con 5 millones (líneas continuas).

El cultivo que inició con 5 millones de cel/mL, requirió un día adicional para igualar el mismo comportamiento de agotamiento de nutrientes. En los cultivos a la tasa de dilución de 0.5 d^{-1} ($60\% \mu_{\max}$) se obtuvieron concentraciones de nutrientes constantes a lo largo del cultivo sin llegar a la carencia de ellos. En cambio, en los cultivos a tasa de dilución de 0.1 d^{-1} ($10\% \mu_{\max}$) no se detectó la presencia de glucosa en algunos puntos. Adicionalmente en los cultivos a la tasa de dilución de 0.1 d^{-1} ($10\% \mu_{\max}$) se observaron concentraciones inferiores de lactato en comparación con los de 0.5 d^{-1} ($60\% \mu_{\max}$). Asimismo, se observó un incremento en la concentración de glutamato a concentraciones superiores a los alcanzados en la tasa de dilución de 0.5 d^{-1} ($60\% \mu_{\max}$). En cuanto a la concentración de amonio se mantuvo alrededor de 5 mM para los cultivos a la tasa de dilución de 0.5 d^{-1} ($60\% \mu_{\max}$). Y tuvieron en concentraciones de alrededor de 8 mM para los cultivos a tasa de dilución de 0.1 d^{-1} ($10\% \mu_{\max}$).

12.2.4 Consumo de medio de cultivo por célula

Se determinó mediante regresión lineal la relación entre la velocidad específica de crecimiento esperada (suponiendo que la velocidad específica de crecimiento es igual a la tasa de dilución) y el consumo de medio de cultivo por célula a las dos tasas de dilución estudiadas en cultivos semicontinuos en matraz. Para la obtención de la ecuación de la recta, así como la línea de tendencia del gráfico se consideraron los datos de velocidad de consumo de medio de cultivo determinados a partir de los 10 días para la tasa de dilución 0.5 d^{-1} ($n=100$) y a partir de los 13 días para la tasa de dilución 0.1 d^{-1} ($n=88$) considerando las 2 réplicas de cada condición.

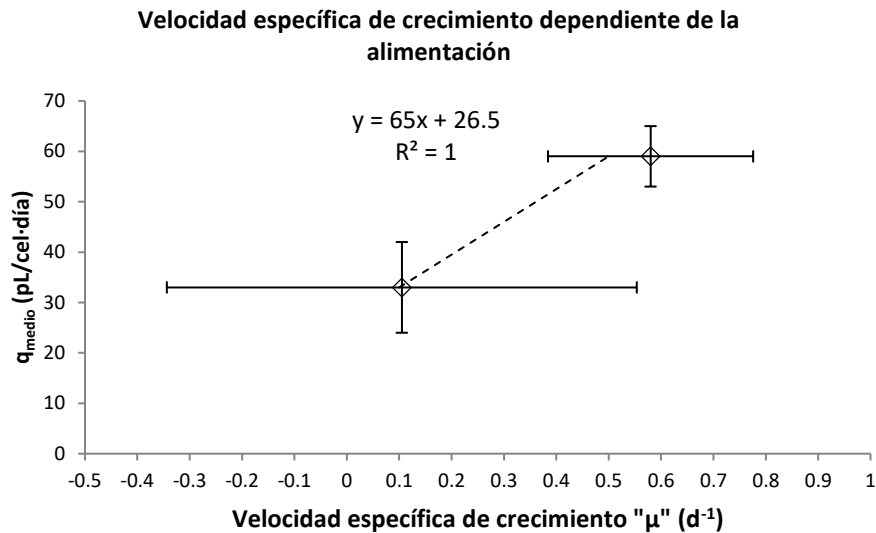


Figura A8. Correlación entre la velocidad específica de crecimiento y el consumo de medio de cultivo.

Es de mencionar que en lugar de haber seleccionado para la construcción del gráfico velocidades de crecimiento teóricas (equivalentes a la tasa de dilución), se pudieron haber seleccionado velocidades de crecimiento reales. Sin embargo, por la gran variabilidad en la velocidad específica de crecimiento determinada en los cultivos (en la fase estable) que son representadas por las barras de error no fueron seleccionadas. La velocidad de crecimiento promedio real en la fase estable para la tasa de dilución de 0.1 d⁻¹ considerando ambos matraces (n=88) fue de 0.1 d⁻¹ con un CV de 430%, y para la tasa de dilución de 0.5 d⁻¹ fue de 0.58 d⁻¹ con un CV de 33%.

12.3 Cultivo continuo en biorreactor tipo perfusión

Se realizaron 2 cultivos independientes en biorreactor en configuración de perfusión como se describe en el apartado de métodos. El objetivo de ambos fue alcanzar una fase estable con una concentración celular de 15 millones. Asimismo, se buscaba controlar la velocidad específica de crecimiento al 50% de μ_{max} en uno de ellos y en el otro se buscaba inicialmente una velocidad de crecimiento del 10% de μ_{max} . Para operar ambos cultivos se partió de la tasa de dilución calculada a partir de la curva de consumo de medio de cultivo obtenida de los cultivos semicontinuos. No obstante, la velocidad de crecimiento en el cultivo 10% de μ_{max} fue superior a la

objetivo. Por lo cual, durante el cultivo se redujo la tasa de dilución por debajo del valor calculado y no se logró reducir la velocidad de crecimiento a la objetivo. Considerando que se tenía el riesgo de reducir la viabilidad celular como se observó en los matraces (viabilidades por debajo del 50%), se decidió replantear la velocidad de crecimiento objetivo al 20% de μ_{\max} .

12.3.1 Determinación de la concentración celular durante los cultivos

Como se mencionó en métodos, se determinó la concentración celular mediante la utilización de cámara de Neubauer 2 veces al día. Adicionalmente, mediante el sensor de biomasa futura se obtuvieron valores de capacitancia durante los cultivos. Mediante la correlación de la concentración celular determinada en la cámara de Neubauer y los datos de capacitancia se obtuvo una regresión polinomial de cuarto grado. A partir de esta regresión fue posible determinar la concentración celular en cualquier punto del cultivo, mediante la utilización de los datos de capacitancia registrados por el sensor de biomasa.

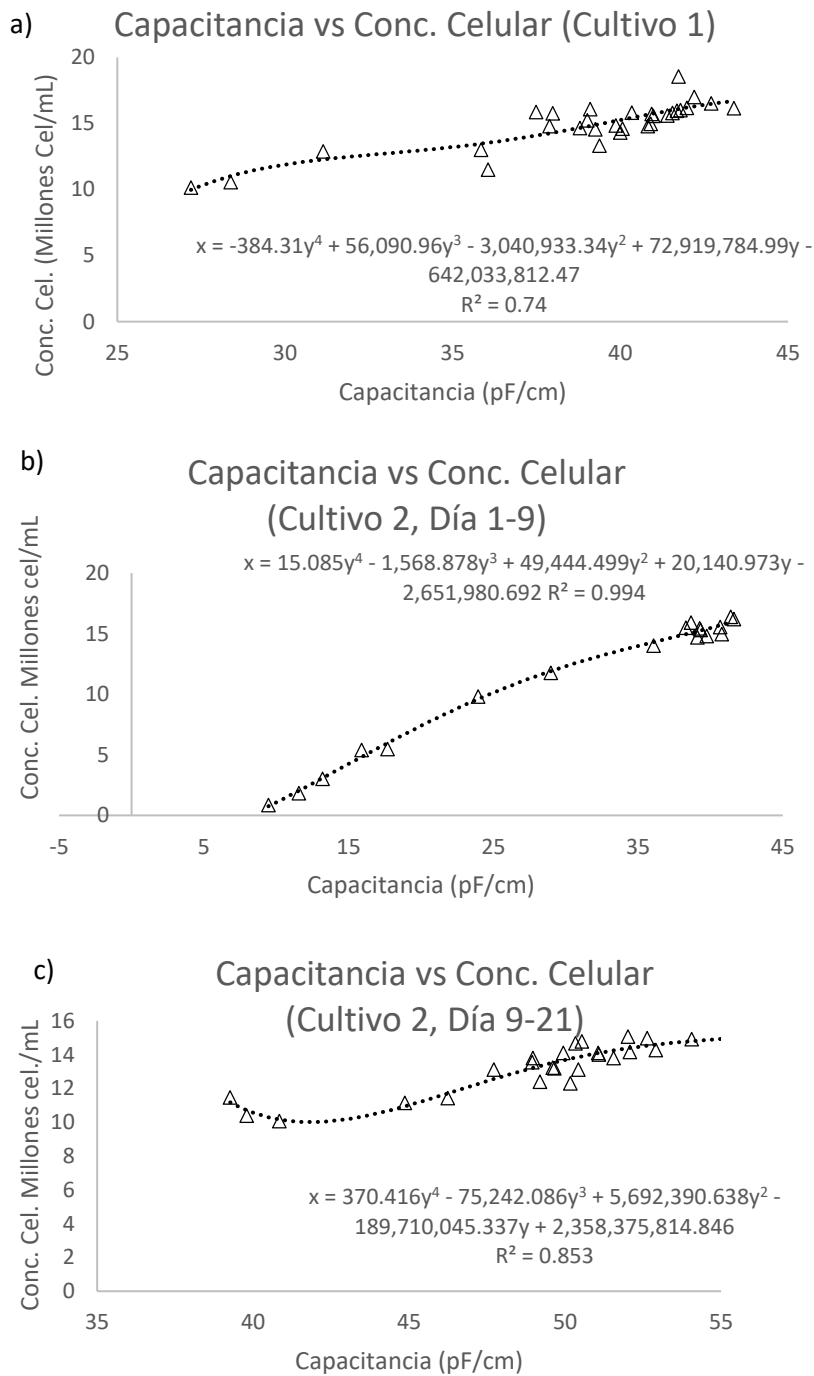


Figura A9. Correlación de la concentración celular y la capacitancia. Se muestra la concentración celular determinada en cámara de Neubauer con el respectivo valor de capacitancia (triángulos) reportado por el sensor de biomasa futura. A partir de estos datos se construyeron curvas que obedecen modelos polinomiales de cuarto grado (línea punteada). a) representa el modelo para el cultivo perfusión al 50% de μ_{max} , b) y c) representan los modelos para el cultivo perfusión al 20% de μ_{max} . En el segundo lote debido a un evento presentado durante el cultivo se observó cambio en la correlación capacitancia-concentración celular por lo que se construyó una segunda curva a partir del día 9.

Considerando que se obtuvieron coeficientes de regresión bajos en las curvas de correlación de concentración celular y capacitancia, se retó cada uno de los modelos contra los valores obtenidos manualmente. Asimismo, se calculó el % de datos que

se encontraban dentro de coeficientes de variación del 5% y del 10% así como el coeficiente de variación para el 100% de los datos, reportándose en la Tabla A6.

Tabla A6. Correlación entre concentraciones celulares determinadas en cámara de Neubauer y el sensor de biomasa Futura.

Modelo	Datos con menos de 5% CV (%)	Datos con menos de 10% CV (%)	CV para el 100% datos
Cultivo 1 (50% μ_{max})	66 % datos	86 % datos	17% CV
Cultivo 2 (20% μ_{max}), día 1 a día 9	72 % datos	83 % datos	11% CV
Cultivo 2 (20% μ_{max}) día 9 a día 21	80 % datos	96 % datos	12% CV

12.3.2 Cultivo perfusión al 50% de μ_{max}

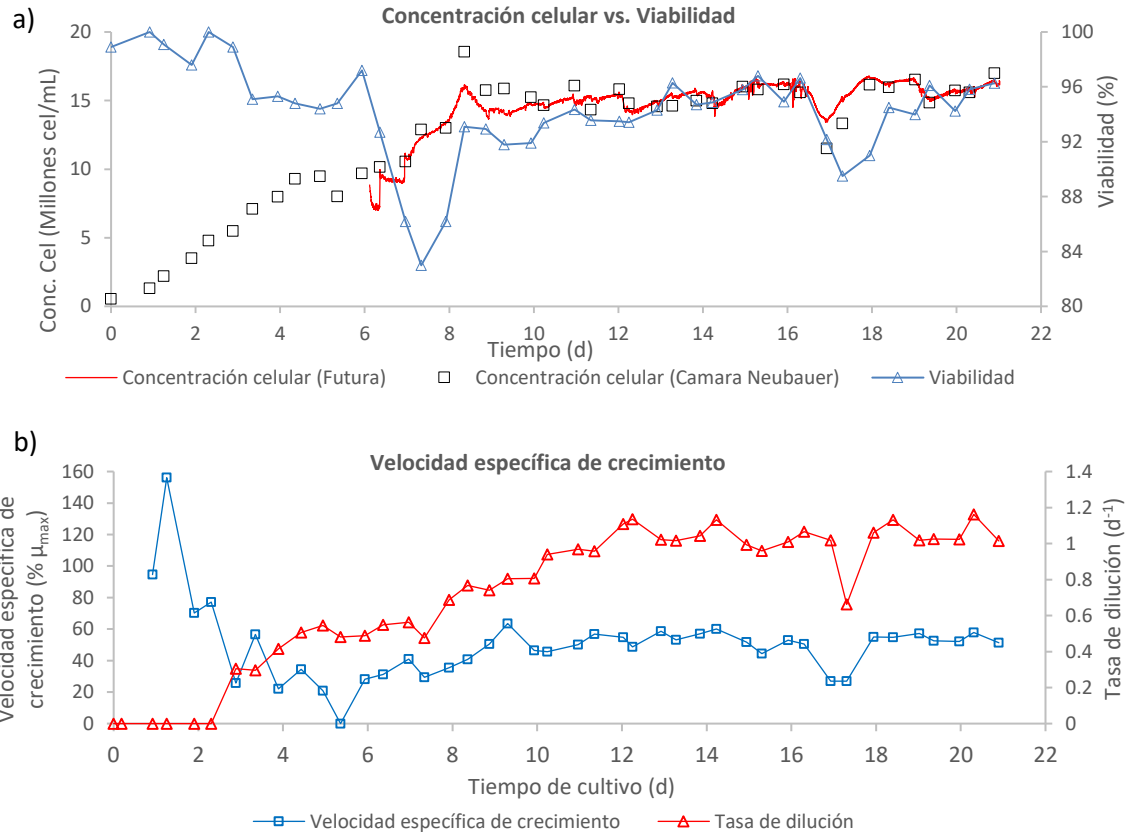


Figura A10. Cinética de crecimiento durante el cultivo de perfusión al 50% de μ_{max} . a) Se muestra la concentración celular y viabilidad. Los cuadros y triángulos fueron datos determinados manualmente. La concentración celular en rojo fue calculada a partir de la capacitancia del sensor de biomasa. Es representada sin símbolos, porque fue determinada de manera continua aproximadamente cada minuto. La línea roja inicia a los 6 días debido a falla en el sistema de registro de datos del software del sensor de biomasa. b) Se muestra el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento durante el cultivo en el eje primario de las ordenadas. En el eje secundario se muestra la tasa de dilución durante el cultivo, la cual inició al segundo día.

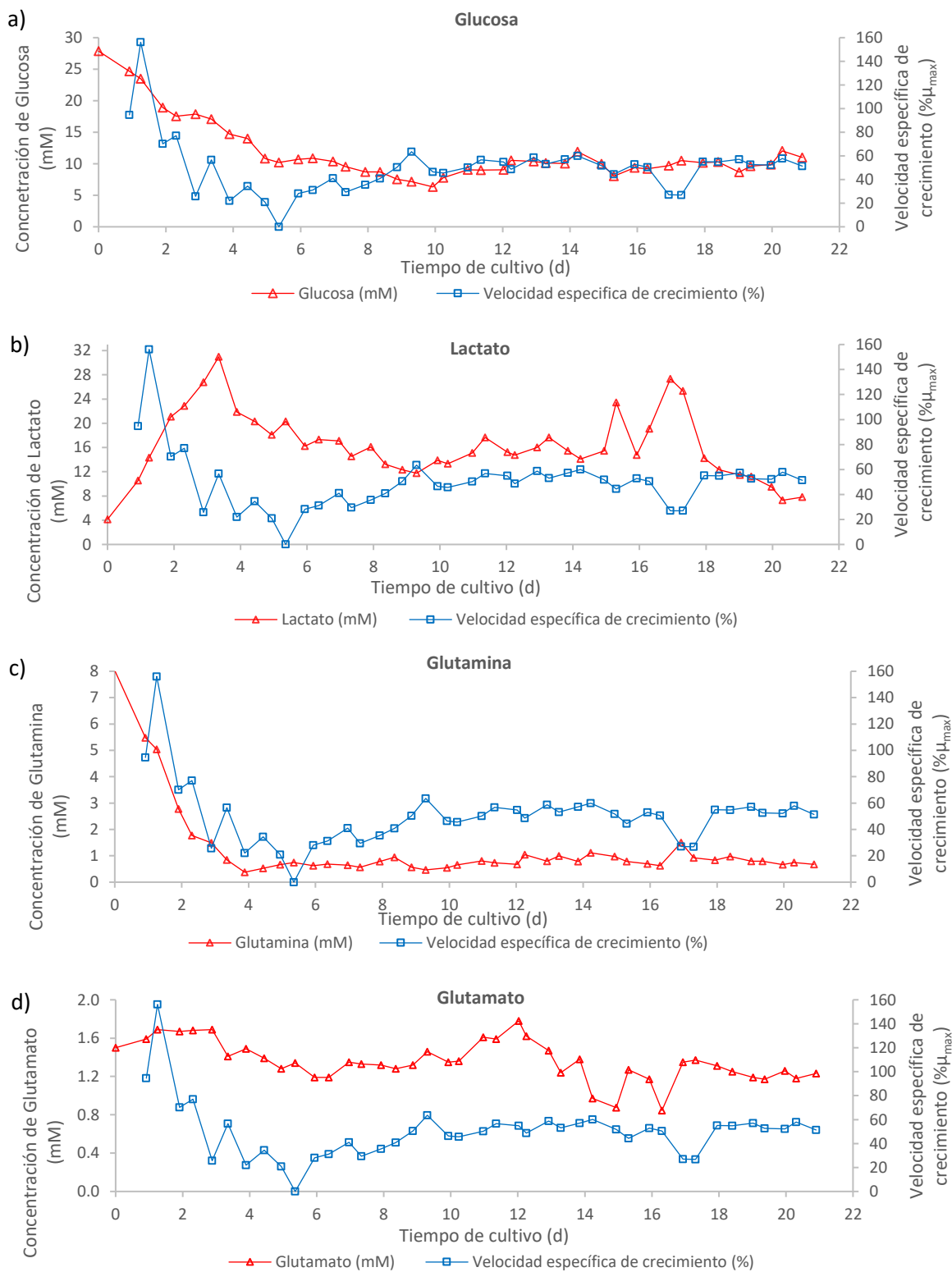


Figura A11. Cinéticas de las concentraciones de los distintos nutrientes del medio de cultivo de perfusión al 50% de μ_{max} . En el eje primario se muestran los diferentes metabolitos. a) Glucosa, b) lactato, c) glutamina, d) glutamato y e) amonio. En el eje secundario se muestra la velocidad específica de crecimiento.

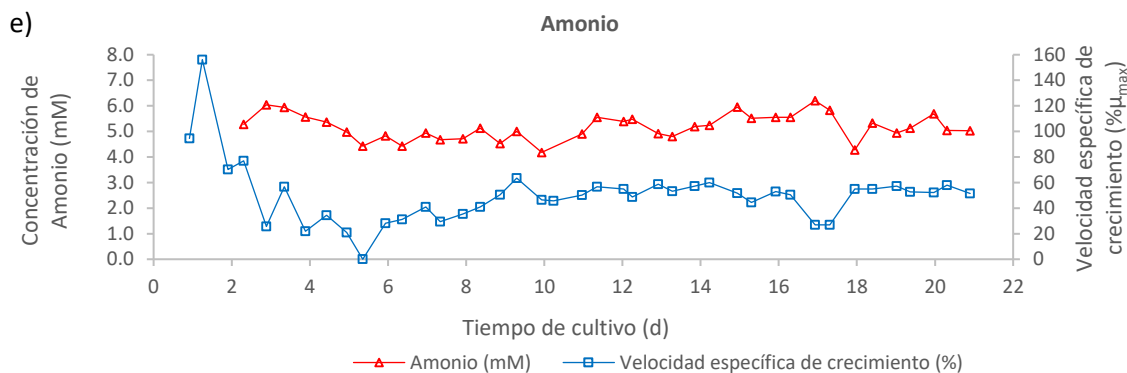


Figura A11. (Continuación). Cinéticas de las concentraciones de los distintos nutrientes del medio de cultivo de perfusión al 50% de μ_{max} . En el eje primario se muestran los diferentes metabolitos. a) Glucosa, b) lactato, c) glutamina, d) glutamato y e) amonio. En el eje secundario se muestra la velocidad específica de crecimiento.

12.3.3 Cultivo perfusión al 20% de μ_{max}

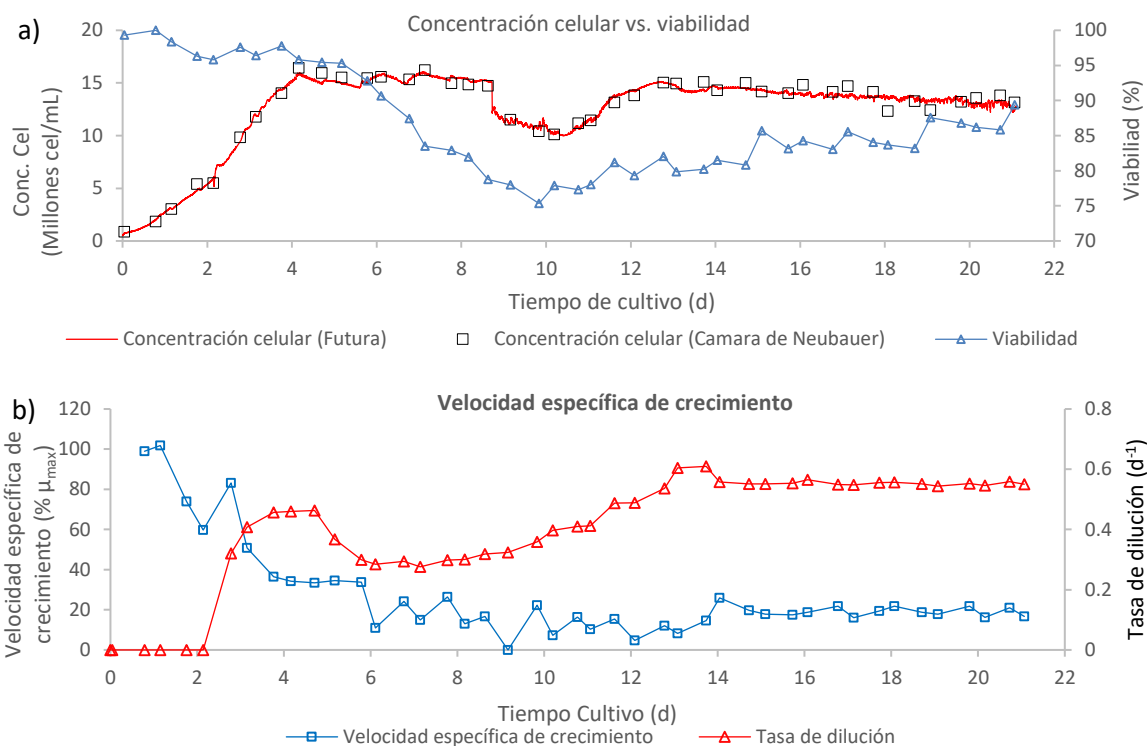


Figura A12. Cinética de crecimiento durante el cultivo de perfusión al 20% de μ_{max} . a) Se muestra la concentración celular y viabilidad. Los cuadros y triángulos fueron datos determinados manualmente. La concentración celular en rojo fue calculada a partir de la capacitancia del sensor de biomasa. Es representada sin símbolos, porque fue determinada de manera continua aproximadamente cada minuto. b) Se muestra el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento durante el cultivo en el eje primario de las ordenadas. En el eje secundario se muestra la tasa de dilución durante el cultivo, la cual inició al segundo día.

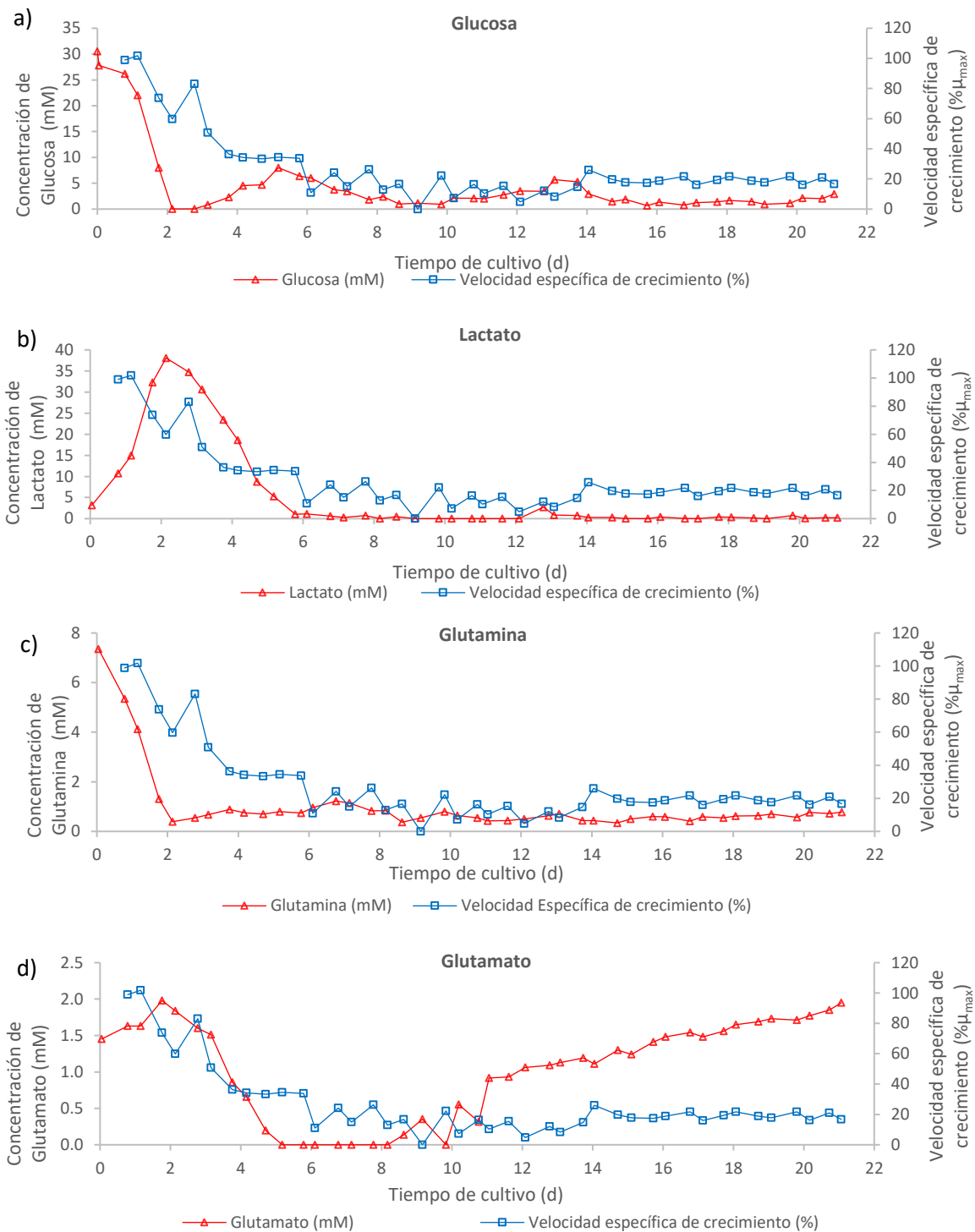


Figura A13. Cinéticas de las concentraciones de los distintos nutrientes del medio de cultivo de perfusión al 20% de μ_{max} . En el eje primario se muestran los diferentes metabolitos. a) Glucosa, b) lactato, c) glutamina, d) glutamato y e) amonio. En el eje secundario se muestra la velocidad específica de crecimiento.

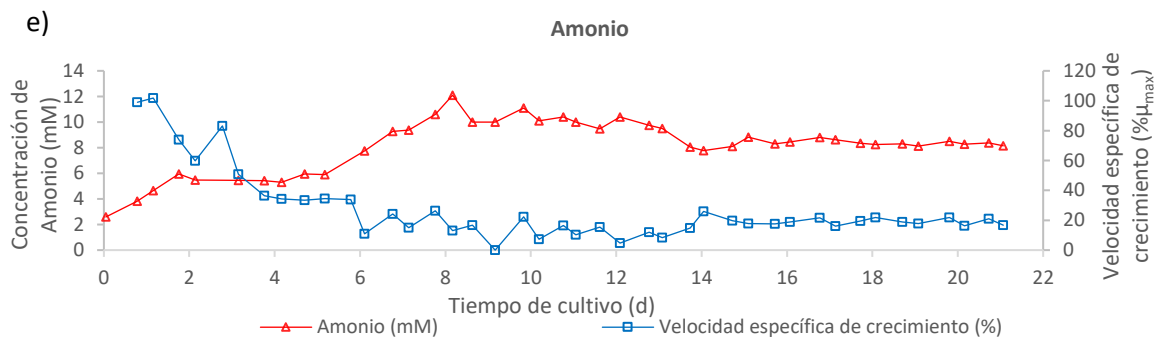


Figura A13. (Continuación). Cinéticas de las concentraciones de los distintos nutrientes del medio de cultivo de perfusión al 20% de μ_{max} . En el eje primario se muestran los diferentes metabolitos. a) Glucosa, b) lactato, c) glutamina, d) glutamato y e) amonio. En el eje secundario se muestra la velocidad específica de crecimiento.

12.4 Análisis de los perfiles de glicosilación y de variantes de carga del AcM

Se realizó un análisis descriptivo reportándose los parámetros de promedio, desviación estándar y coeficiente de variación y por otro lado se realizó un análisis de inferencia estadística para comparar el comportamiento de los distintos cultivos para determinar si tenían varianzas y medias iguales.

El análisis estadístico descriptivo se realizó para los 4 cultivos en estudio. Para cada parámetro estudiado, se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación. Para los análisis estadísticos se utilizaron los valores individuales obtenidos en los análisis del perfil de glicosilación y de variantes de carga. Las réplicas de los datos de los distintos parámetros utilizados para el análisis estadístico fueron diferentes en los diferentes cultivos. Perfusión 50% μ_{max} y perfusión 20% μ_{max} tuvieron $n=3$. Matraz 60% μ_{max} tuvo $n=5$ para variantes de carga y $n=6$ para glicofomas. Matraz 10% μ_{max} tuvo $n=6$.

12.4.1 Variantes de carga

Tabla A7. Estadística descriptiva de la distribución de las variantes de carga. Se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Cultivo	Ácidas (%)			Principal (%)			Básicas (%)		
	Promedio	DE	CV	Promedio	DE	CV	Promedio	DE	CV
Perfusión 50% μ_{\max}	36	3	8	40	1	3	23	4	18
Perfusión 20% μ_{\max}	31	2	6	49	1	3	20	0	2
Matraz 60% μ_{\max}	29	3	10	40	1	3	31	4	12
Matraz 10% μ_{\max}	38	4	10	37	2	6	25	3	11

12.4.2 Perfil de glicosilación

Tabla A8. Perfil de glicosilación del anticuerpo. Se muestran las distintas especies de glicanos encontrados con su media y desviación estándar.

Glicoforma	Matraz 10% μ_{\max} (%)	Perfusión 20% μ_{\max} (%)	Perfusión 50% μ_{\max} (%)	Matraz 60% μ_{\max} (%)
N2M3	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0
N2FM3	1.2 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.4
N2FM3N (1,3)	3.1 ± 0.9	2.2 ± 0.6	0.4 ± 0.3	1.6 ± 1.3
A2	19.0 ± 5.2	7.6 ± 0.8	1.5 ± 0.6	2.8 ± 1.8
N2FM3N (1,6)	1.3 ± 1.7	3.1 ± 0.3	2.6 ± 0.4	3.1 ± 1.7
No identificado	4.0 ± 2.9	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.8	4.3 ± 1.6
A2F	57.1 ± 7.7	56.9 ± 0.6	66.5 ± 1.9	70.5 ± 3.0
M5	7.4 ± 8.1	14.8 ± 1.3	1.8 ± 1.4	1.8 ± 1.6
A2G1 (1,6)	1.2 ± 0.7	1.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.5
A2G1 (1,3)	0.5 ± 0.6	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.4
A2FG1 (1,6)	3.9 ± 1.3	7.7 ± 1.8	16.1 ± 1.6	9.6 ± 1.1
A2FG1(1,3)	1.3 ± 0.6	2.3 ± 0.7	5.5 ± 0.7	3.4 ± 0.7
A2FG2	0.0 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	0.8 ± 1.0

Tabla A9. Estadística descriptiva de la abundancia relativa de los glicanos paucimanosa, manosa 5 y no identificados. Se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Cultivo	Paucimanosa (%)			Manosa 5 (%)			No identificados (%)		
	Promedio	DE	CV	Promedio	DE	CV	Promedio	DE	CV
Perfusión 50% μ_{\max}	0.3	0.1	23	1.8	1.4	78	2.9	0.8	28
Perfusión 20% μ_{\max}	0.3	0.1	22	14.8	1.3	9	2.7	0.3	13
Matraz 60% μ_{\max}	0.6	0.5	78	1.8	1.6	86	4.3	1.6	38
Matraz 10% μ_{\max}	1.2	1.3	103	7.4	8.1	110	4.0	2.9	72

Tabla A10. Estadística descriptiva de la abundancia relativa de los glicanos híbridos, complejos y G0. Se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Cultivo	Híbridos (%)			Complejos (%)			G0 (%)		
	Promedio	DE	CV	Promedio	DE	CV	Promedio	DE	CV
Perfusión 50% μ_{\max}	3.0	0.7	23	92.0	1.3	1	68.0	2.0	3
Perfusión 20% μ_{\max}	5.3	0.7	14	76.9	1.7	2	64.5	1.4	2
Matraz 60% μ_{\max}	4.7	2.8	59	88.6	3.2	4	73.3	3.4	5
Matraz 10% μ_{\max}	4.4	2.1	48	83.0	8.8	11	76.1	8.1	11

Tabla A11. Estadística descriptiva de la abundancia relativa de los glicanos G1, G2 y Fucosilados. Se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Cultivo	G1 (%)			G2 (%)			Fucosilados (%)		
	Promedio	DE	CV	Promedio	DE	CV	Promedio	DE	CV
Perfusión 50% μ_{\max}	22.8	2.4	11	1.2	0.1	11	92.3	1.1	1
Perfusión 20% μ_{\max}	11.9	2.8	24	0.5	0.2	43	72.7	1.3	2
Matraz 60% μ_{\max}	14.4	2.2	15	0.8	1.0	121	89.4	2.8	3
Matraz 10% μ_{\max}	6.9	1.8	26	0.0	0.1	245	68.0	10.4	15

En la Tabla 12 se muestran los criterios utilizados para la discriminar si picos no identificados en algunas de las muestras correspondían a glicanos.

Tabla A12. Discriminación de glicanos no identificados mediante digestión enzimática.

Enzima aplicada/estructura propuesta	Pico problema	Pico problema	Pico problema	Pico problema
β-hexosaminidasa	No degradado	Degradado	No degradado	Degradado
α-manosidasa	No degradado	Degradado	Degradado	No degradado
	No es un N-glicano	Híbrido	Manosilado	Complejo

12.5 Análisis estadístico

En este apartado se muestran los resultados del análisis de inferencia estadística para el perfil de glicosilación, variantes de carga, productividad y rendimiento.

Se realizó un análisis estadístico de comparación de medias (prueba t de Student) y comparación de varianzas (prueba F de Fisher) entre los cultivos perfusión 50% μ_{max} y perfusión 20% μ_{max} . Para los análisis estadísticos se utilizaron los valores individuales obtenidos en los análisis del perfil de glicosilación, variantes de carga y productividad, con n=3 para ambos cultivos.

Los análisis de comparación de medias y varianzas se muestran en la Tabla A13, se reporta en la Tabla como “D” que corresponde a que los cultivos son diferentes o “I” que corresponde a que son iguales. El comparativos de medias entre los cultivos perfusión 50% μ_{max} y perfusión 20% μ_{max} fue utilizado para determinar el efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre el perfil de glicosilación y de variantes de carga.

Tabla A13. Dictamen de las pruebas t de Student y F de Fischer del comparativo del perfil de glicosilación, perfil de variantes de carga, productividad y rendimiento del AcM producido a diferentes velocidades de crecimiento.

Parámetro	Medias	σ
Paucimanosa	I	I
Manosa 5	D	I
No identificados	I	I
Híbridos	D	I
Complejos	D	I
G0	I	I
G1	D	I
G2	D	I
Fucosilados	D	I
Variantes de carga ácidas	I	I
Fracción principal	D	I
Variantes de carga básicas	I	D
Productividad de AcM	D	I
Rendimiento de AcM	D	D

12.6 Electroforesis en gel

En este apartado se muestran las separaciones por electroforesis en gel de las muestras a las cuales se les determino el perfil de glicosilación y variantes de carga. Las condiciones nativas se utilizaron para observar a la proteína completa, y las condiciones reductoras para identificar las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. Se utilizó como referencia AcM producido previamente, utilizando la misma línea celular, pero en cultivos lote alimentado.

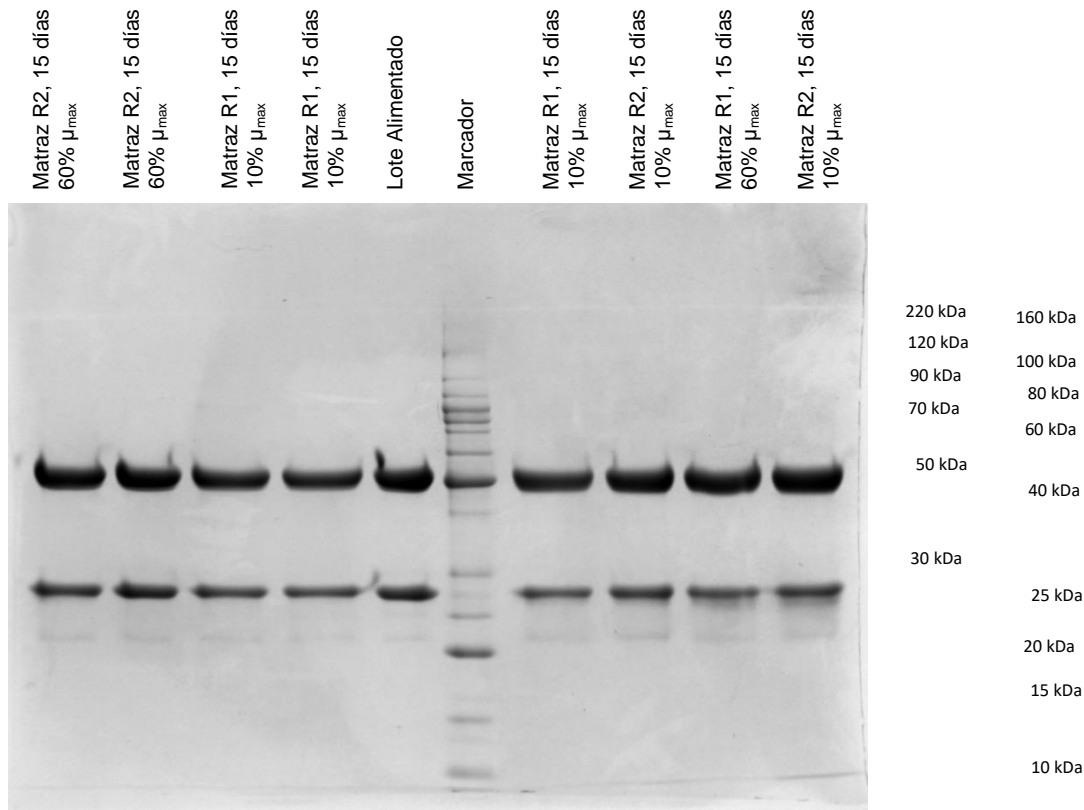


Figura A14. SDS-PAGE en condiciones reductoras, para cultivos semicontinuos a un periodo de 15 días. En este gel se cargaron las muestras de los matraces R1 y R2 60% μ_{max} y matraces R1 y R2 10% μ_{max} , todas correspondiendo al periodo de 15 días de cultivo, es de notar que algunas de ellas fueron cargadas en más de una ocasión obedeciendo esto a que se cargaron diferentes fracciones obtenidas durante la purificación por cromatografía con proteína A, no observándose diferencias entre ellas. Se observa para todas las muestras 2 bandas principales una a 25 kDa (cadena ligera) y otra a 50 kDa (cadena pesada).

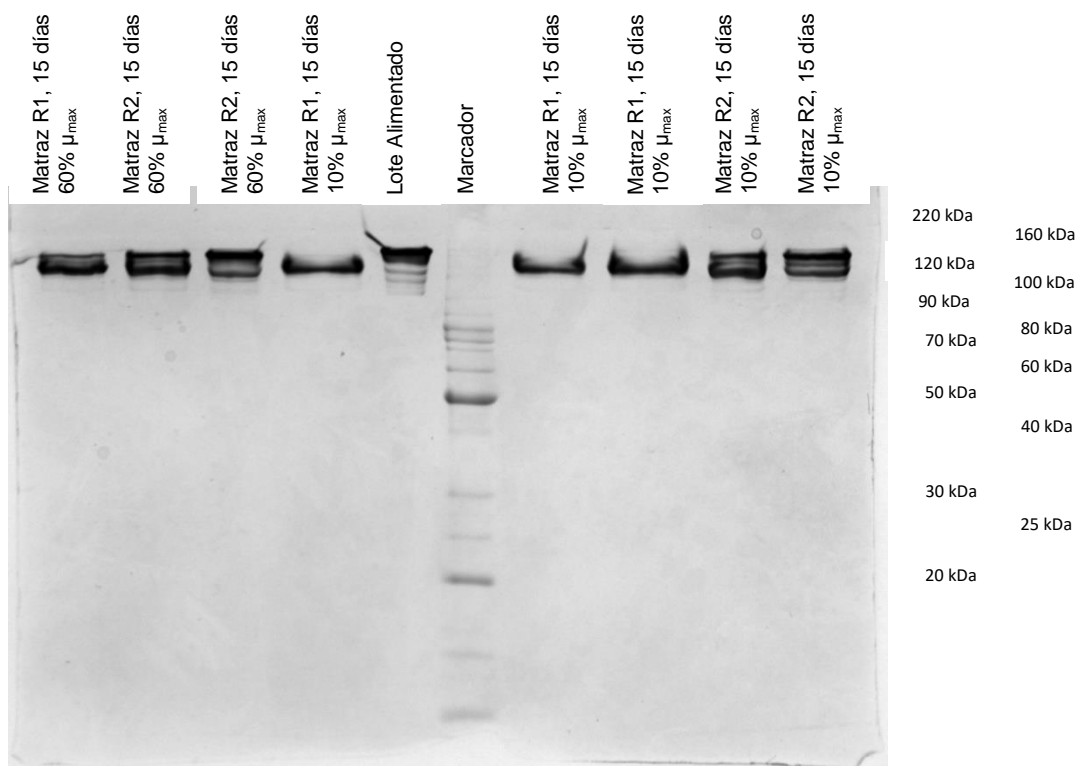


Figura A15. SDS-PAGE en condiciones nativas para cultivos semicontinuos a un periodo de 15 días. En este gel se cargaron las muestras de los matraces R1 y R2 60% μ_{max} y matraces R1 y R2 10% μ_{max} , todas correspondiendo al periodo de 15 días de cultivo, es de notar que algunas de ellas fueron cargadas en más de una ocasión obedeciendo esto a que se cargaron diferentes fracciones obtenidas durante la purificación por cromatografía con proteína A, no observándose diferencias entre ellas. Se observa para todas las muestras una banda con un peso de alrededor de 150 kDa.

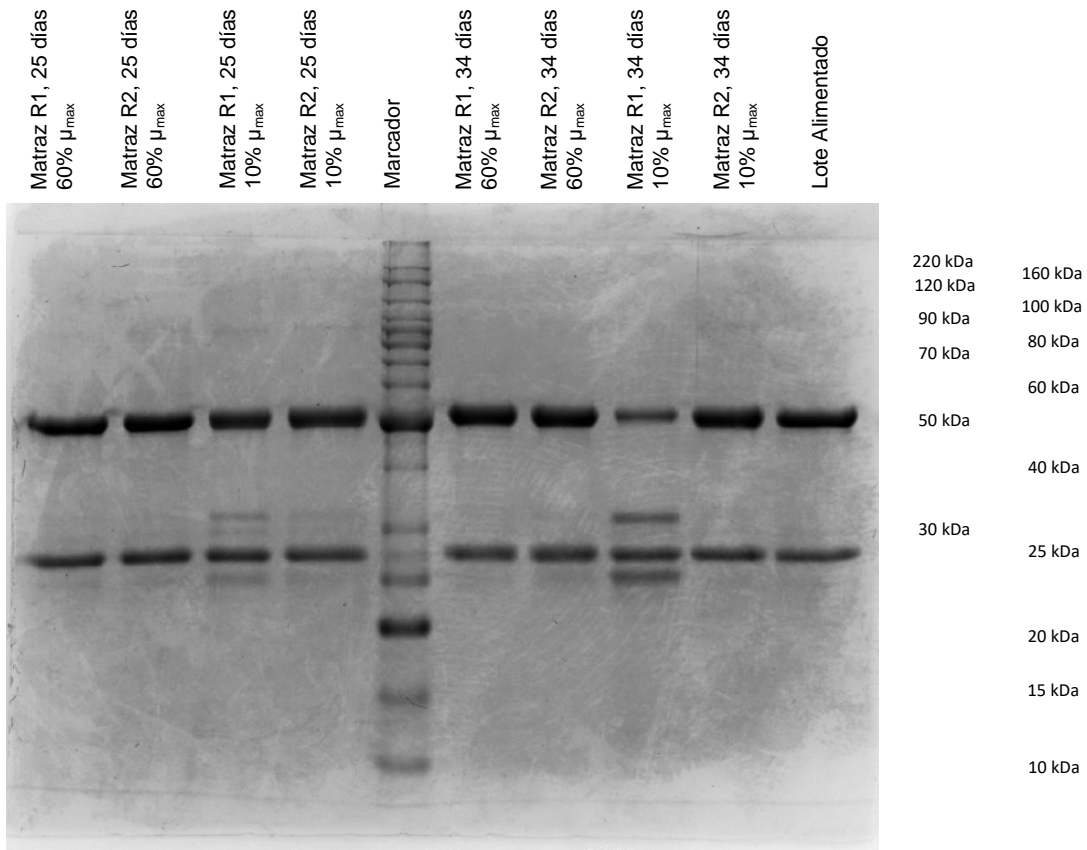


Figura A16. SDS-PAGE en condiciones reductoras, para cultivos semicontinuos de 25 y 34 días. En este gel se cargaron las muestras de los matraces R1 y R2 60% μ_{max} y matraces R1 y R2 10% μ_{max} , correspondiendo a los periodos de 25 y 34 días de cultivo, se observan para todas las muestras 2 bandas principales una a 25 kDa (cadena ligera) y otra a 50 kDa (cadena pesada).

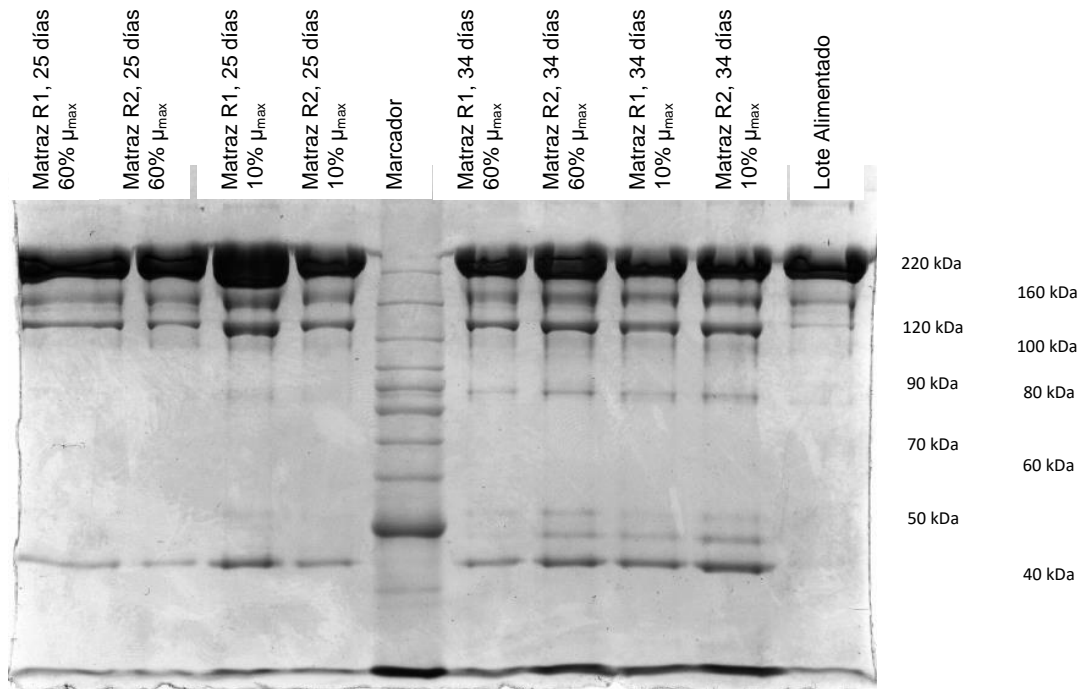


Figura A17. SDS-PAGE en condiciones nativas, para cultivos semicontinuos a 25 y 34 días. En este gel se cargaron las muestras de los matraces R1 y R2 60% μ_{max} y matraces R1 y R2 10% μ_{max} . La banda de interés tiene un peso de alrededor de 150 kDa. Se puede observar una banda densa entre el marcador de 160 y 220 kDa que representa al anticuerpo integro. Adicionalmente, se observan una serie de bandas de menor nitidez a lo largo del gel que pudieran deberse a moléculas de anticuerpo incompleto ya que en su forma nativa el anticuerpo está conformado por dos cadenas pesadas de 50 kDa cada una, así como de dos cadenas ligera de 25 kDa cada una. Nótese que el anticuerpo producido en cultivo lote alimentado presenta menor cantidad de bandas de bajo peso molecular, incrementándose estas en las muestras de 25 días y siendo más numerosas en las muestras de 34 días.

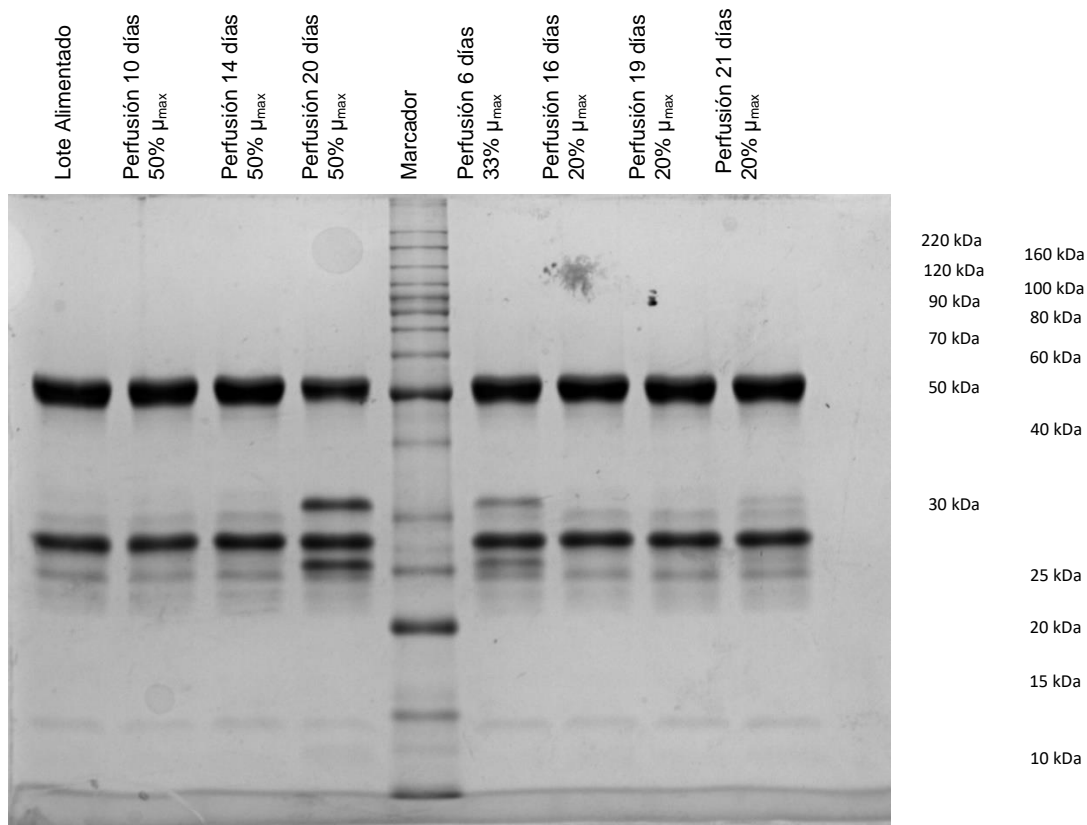


Figura A18. SDS-PAGE en condiciones reductoras para cultivos de perfusión. En este gel se cargaron las muestras de los cultivos al 50% de μ_{max} y 20% de μ_{max} . Asimismo, una muestra en la fase no estable del cultivo al 20% de μ_{max} que se identifica como 33% de μ_{max} y un control que corresponde a AcM producido en un cultivo lote alimentado. Se pueden observar las dos bandas principales esperadas que corresponden a 25 kDa (cadena ligera) y otra a 50 kDa (cadena pesada). Adicionalmente se observan algunas bandas de menor densidad siendo más intensas en la muestra de 20 días del cultivo al 50% de μ_{max} , así como en la muestra al 33% de μ_{max} . Estas bandas posiblemente corresponden a anticuerpos incompletos o que sufrieron alteraciones. El resto de los carriles se observan similares al control en cultivo tipo lote alimentado.

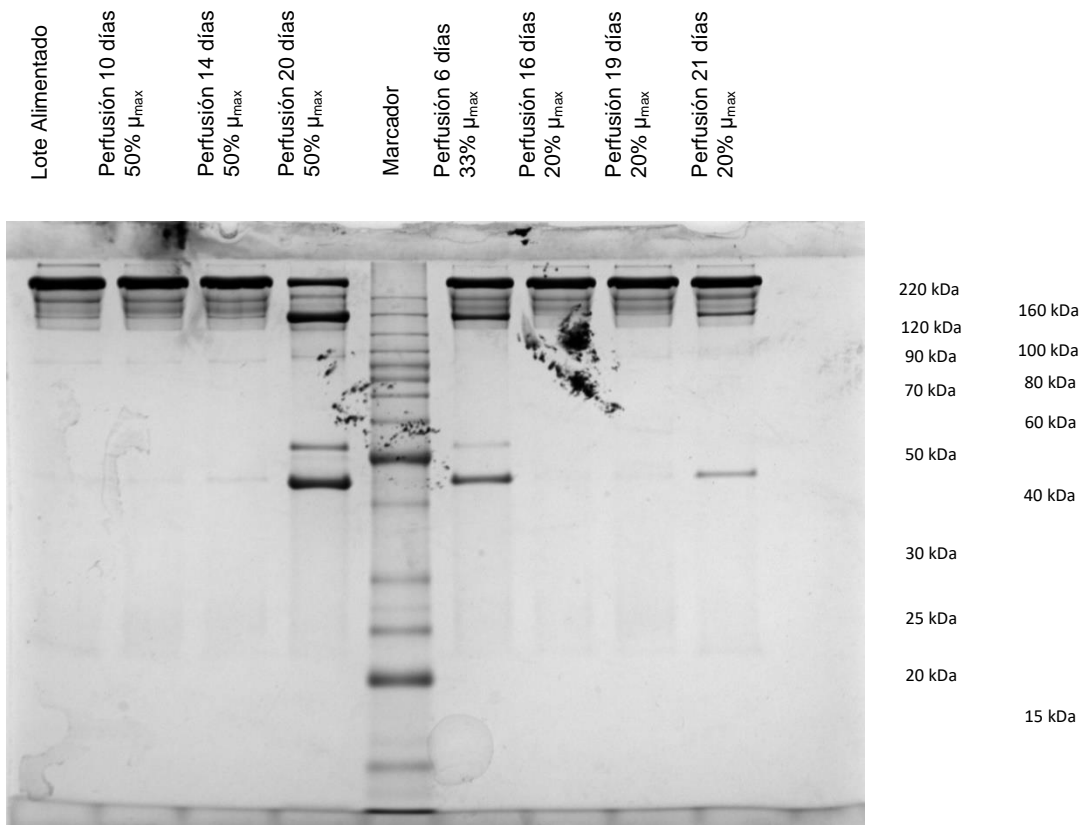


Figura A19. SDS-PAGE en condiciones nativas, para cultivos de perfusión. En este gel se cargaron las muestras los cultivos al 50% de μ_{max} y 20% de μ_{max} y una muestra fuera de la fase estable del cultivo al 20% de μ_{max} que se identifica como 33% de μ_{max} . Asimismo, un control del cultivo lote alimentado. Se puede observar una banda densa a la altura del marcador de 220 kDa, resultando atípico que no migrara la proteína junto con el marcador de 160 kDa. En este sentido, es de considerar que la migración corresponde con la muestra control del cultivo lote alimentado, que se ha corrido en múltiples ocasiones. Se observa adicionalmente al igual que en el gel reductor la presencia de otras bandas de menor peso molecular las cuales pueden indicar degradación del anticuerpo produciendo formas incompletas en cuanto a su composición en cadenas pesadas y/o ligeras.

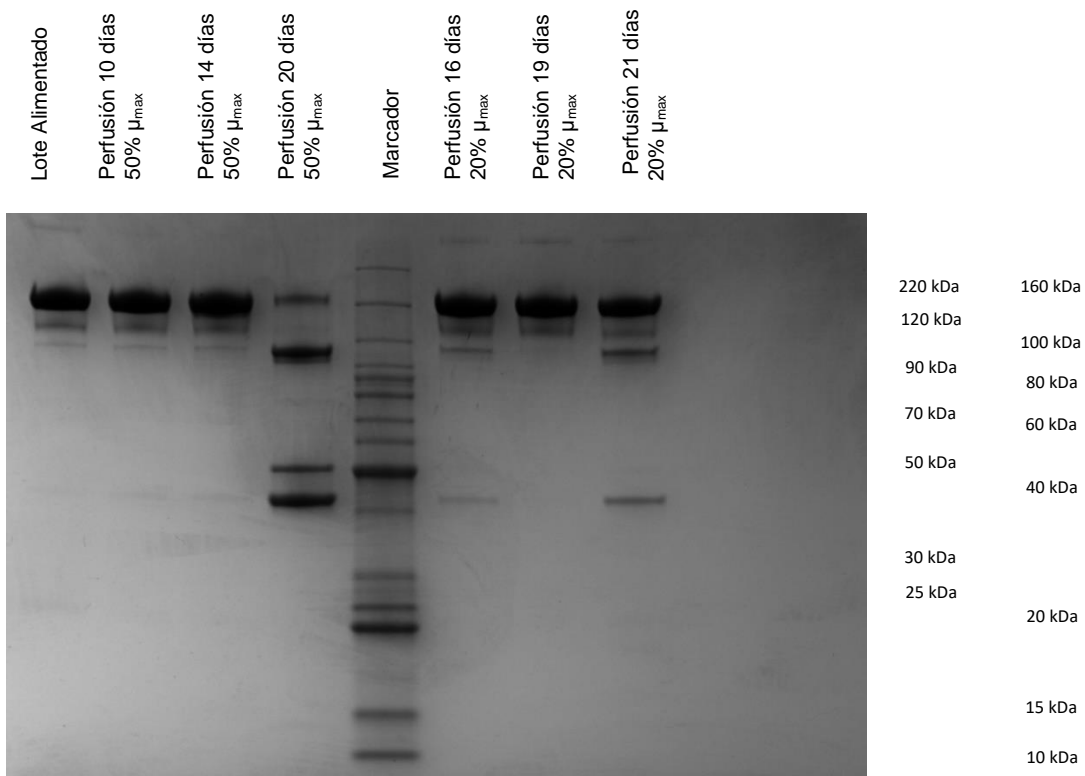


Figura A20. SDS-PAGE en condiciones nativas, utilizando un gel de gradiente, para cultivos de perfusión. En este gel se cargaron las muestras los cultivos al 50% de μ_{max} y 20% de μ_{max} , así como un control de un cultivo lote alimentado. Se puede observar una banda densa a la altura del marcador de 160 kDa. Adicionalmente, se observan al igual que en el gel reductor la presencia de otras bandas de menor peso molecular, las cuales pueden indicar degradación del anticuerpo produciendo formas incompletas en cuanto a su composición en cadenas pesadas y/o ligeras.