



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

La metilación del ADN como posible factor epigenético importante en la heterogeneidad de sub clonas de células CHO recombinantes productoras de un anticuerpo monoclonal

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. César Rodrigo Coria Gómez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva  
Instituto de Biotecnología

Dra. Norma Adriana Valdéz Cruz  
Instituto de Investigaciones Biomédicas



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.

Ciudad de México. enero, 2022

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich y la Dra Laura Alicia Palomares Aguilera, perteneciente al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Se agradece haber contado con el apoyo de una beca de maestría otorgada por CONACYT (CVU: 956110) durante la realización de este trabajo.

Se agradece a Laboratorios Liomont SA de CV.

Se agradece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IT200521 de la UNAM IV200420.

Se agradece a DGAPA, número de proyecto DGAJ-DPI-070514-856.

Jurado de examen:

- Dr. Alejandro Alagón Cano
- Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez
- Dra. Mayra Furlan Magaril
- Dr. Mauricio Trujillo Roldán
- Dra. Viviana Valadez Graham

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Tonatiuh Ramírez y la Dra. Laura Palomares por haberme acogido dentro de su grupo, así como por todo su apoyo y guía, que ha contribuido enormemente a mi crecimiento profesional a lo largo de estos años.*

*A mi Comité Tutoral, la Dra. Adriana Valdés y Dr. Gustavo Pedraza por sus valiosas críticas y oportunos consejos.*

*A las técnicas académicas del grupo: Vanesa, Ruth y muy especialmente a Martita por su disposición siempre a ayudarnos y estar pendiente de cuanto podamos necesitar.*

*A mi familia, en especial a mis madre Emilia y hermana Paulina, que a pesar de la distancia siempre han sido el pilar incondicional en cada paso de mi vida.*

*A todos mis compañeros del grupo GPR por la acogida, por todo el tiempo compartido y por todo el apoyo, en especial a Jorge, Anayeli, Michell, Alberto, Juan Carlos, Bere, Estephania... que son algunos de los grandes que me han acompañado.*

# ÍNDICE

I.	GLOSARIO .....	6
II.	RESUMEN.....	8
III.	Introducción .....	10
	3.1 – Las células CHO como sistema de expresión de proteínas recombinantes .....	10
	3.2 – Heterogeneidad de las células CHO.....	11
	3.3 – Epigenética y metilación del ADN en células CHO .....	12
	3.4 – Mecanismos de metilación y desmetilación del ADN.....	16
IV.	MARCO TEÓRICO.....	18
	4.1 – Métodos de selección para líneas celulares de mamíferos y su impacto en la heterogeneidad.....	18
	4.2 – Metabolismo de células CHO .....	20
	4.3 – Proteínas recombinantes .....	21
	4.3.1 – Glicosilación .....	22
	4.3.2 – <i>N</i> -glicosilación .....	22
	4.3.3 – Estructura y glicosilación de inmunoglobulinas humanas .....	24
V.	Justificación.....	26
VI.	Hipótesis .....	26
VII.	Objetivos .....	26
	7.1 – Objetivo general.....	26
	7.2 – Objetivos específicos .....	26
VIII.	Materiales y métodos .....	28
	8.1 – Estrategia general.....	28
	8.2 – Estrategia particular .....	28
	8.2.1 – Historia de las sub clonas .....	28
	8.2.2 – Cultivo y mantenimiento celular.....	29
	8.2.3 – Bancos celulares .....	30
	8.2.4 – Criopreservación y descongelamiento .....	30
	8.2.5 – Determinación de la concentración celular empleando el contador de partículas Coulter Counter <sup>TM</sup> . .....	32
	8.2.6 – Determinación de la concentración y viabilidad celular en cámara de Neubauer. ....	32
	8.2.7 – Cinéticas de cultivo .....	33
	8.2.8 – Cuantificación de la concentración de metabolitos.....	34
	8.2.9 – Cálculo del rendimiento de metabolitos.....	34

8.2.10 – Cálculo de velocidades de consumo de nutrientes o generación de metabolitos secundarios.....	35
8.2.11– Purificación del anticuerpo mediante afinidad proteína A.....	35
8.2.12 – Cuantificación de la productividad del AcM.....	36
8.2.13 – Determinación del perfil de N-glicosilación del AcM por Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica (HILIC).....	37
8.2.14 – Cultivos con 5-Aza-2`deoxitidina (5Aza2) y análisis de metilación... 38	
8.2.14 – Análisis estadístico.....	39
IX. Resultados y discusión.....	40
9.1 – Caracterización inicial de las sub clonas .....	40
9.2 – Cambio en el porcentaje de metilación del ADN ante una hipometilación aleatoria.....	52
9.3 – Efectos de la hipometilación sobre la cinética y metabolismo celular .....	54
X. Conclusiones.....	62
XI. Perspectivas.....	64
XII. Referencias .....	65
XIII. Anexos .....	80

# I. GLOSARIO

$\mu$	Velocidad de crecimiento específica ( $h^{-1}$ )
2AB	2-aminobenzamida
5caC	5-carboxil citosina
5hmC	5-hidroximetil citosina
5fC	5-formil citosina
5Aza2	5-Aza-2'deoxicitocina
AcM	anticuerpo monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASN	Asparagina
BCM	Banco de células maestro
BCT	Banco de células de trabajo
CHO	Células de ovario de hámster chino ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> , por sus siglas en inglés)
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DNMT	ADN metil transferasa
Fc	Fracción cristalizable de un anticuerpo
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNac	N-acetil galactosamina
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Glc	Glucosa
GlcNac	N-acetil glucosamina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GS	Glutamina sintetasa
HILIC	Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica
IgG	Inmunoglobulina G
Lac	Lactato
LDH	Lactato deshidrogenasa

Man	Manosa
MDH	Malato deshidrogenasa
MTX	Metotrexato
MSX	Metionina sulfoximina
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
OST	Oligo transferasa
q	Productividad específica ( $\text{pmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
RE	Retículo endoplásmico
SAM	S-adenosil metionina
Ser	Serina
TDG	Tiamina ADN glicosilasa
TET	Diez-once translocación (por sus siglas en inglés)
Thr	Treonina
Y	Rendimientos específicos ( $\text{cel} \cdot \text{pmol}^{-1}$ ), ( $\text{pmol} \cdot \text{cel}^{-1}$ ), ( $\text{mmol} \cdot \text{mmol}^{-1}$ )
Xv	Concentración o densidad celular



## II. RESUMEN

Las células de ovario de hámster chino (CHO) son uno de los modelos de mamíferos predilectos para la producción de proteínas recombinantes ya que cumplen con características deseables, como una alta tasa de producción y biocompatibilidad con proteínas humanas. Sin embargo, aunque cuentan con los factores y la maquinaria necesaria, existe una gran diversidad de fenotipos entre las líneas celulares y las sub clonas generadas en el desarrollo de un proceso, por lo que se requiere de una selección exhaustiva, laboriosa y tardada para obtener una línea celular estable y productiva. Esto resulta en mayores tiempos y costos de producción.

En el presente trabajo se evaluó el papel de la metilación sobre la heterogeneidad de sub clonas de células CHO para determinar si ejerce un papel crítico en su fisiología, así como en la producción y calidad de un anticuerpo monoclonal (AcM) modelo. Primero se hizo una caracterización inicial de cuatro subclonas para determinar sus parámetros cinéticos y estequiométricos, tasas de rendimiento y producción de metabolitos, así como la producción y patrón de *N*-glicosilación del AcM modelo.

Se observó que las cuatro sub clonas siguen el mismo metabolismo de células inmortalizadas que se caracterizan por el efecto Warburg y por un cambio en el metabolismo de lactato que pasa de su producción a su consumo. Sin embargo, se mostró que entre las cuatro subclonas existen diferencias significativas en cuanto a su crecimiento, producción de biomasa, rendimientos de fuentes de carbono y sobre todo en la producción del AcM modelo. Posteriormente, se seleccionaron dos subclonas, la mayor y menor productora para observar el efecto del inhibidor de la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), cuyo mecanismo de acción ocasiona una hipometilación aleatoria del ADN. Se observó una disminución significativa en el porcentaje de metilación para ambas subclonas y un incremento significativo en la producción del AcM la menor sin alterar su patrón de *N*-glicosilación.

Como conclusión, este estudio mostró que una hipometilación provoca cambios en la fisiología y metabolismo de sub clonas de células CHO recombinantes, incrementando la producción del AcM modelo. Estudios futuros serán necesarios para explicar los resultados obtenidos, pudiendo estar relacionado

a un fenómeno de silenciamiento, quizás del transgén del AcM modelo o bien, a nivel de procesamiento y transporte de proteínas en la maquinaria celular.

# III. Introducción

## 3.1 – Las células CHO como sistema de expresión de proteínas recombinantes

Las células de ovario de hámster chino (CHO, por siglas en inglés) constituyen la base del sistema de expresión más común para la producción de proteínas recombinantes en la industria farmacéutica (Kuo et al., 2018). Esto se debe a que cumplen con características deseables como: ser fáciles de cultivar, ya sea en suspensión o adherencia (Xu et al., 2011), con tolerancia a variaciones externas (Mascarenhas et al., 2016), un alto rendimiento en la producción (Kuo et al., 2018), además de ser capaces de secretar el producto de interés al medio con modificaciones postraduccionales similares a las humanas, (Wong et al., 2010; Wurn, 2004; Butler, 2005); característica fundamental para fabricar productos terapéuticos o profilácticos de uso humano (Browne & Al-Rubeai, 2007).

Sin embargo, existe una gran diversidad de fenotipos y genotipos entre las líneas celulares y las sub clonas (Davies et al., 2012) generadas durante el proceso de clonación de la proteína recombinante. Desde el punto de vista práctico, esta variación clonal se puede explotar para aislar líneas celulares con características deseables, entendiéndose como los requisitos a cumplir para considerarse aptas para fines de producción; por ejemplo, la capacidad de proliferar en entornos artificiales (Barnes et al., 2006), lograr altas tasas de crecimiento y sintetizar eficientemente y con alta calidad el producto de interés (Davies *et al*, 2012). A pesar de esto, también puede dar lugar a un comportamiento impredecible como la pérdida de productividad y contribuir a la variación indeseada en atributos funcionales, como patrones de glicosilación (van berkel et al, 2009) y velocidad de crecimiento (Barnes et al, 2006). Las acciones para contender con las consecuencias de esta variación genética-funcional y su aparición durante el desarrollo de una línea celular, puede elevar los costos de producción, el tiempo y la mano de obra (Davies et al, 2012).

Esta variación no se limita a líneas celulares genéticamente modificadas, pues se ha observado tanto en células transfectadas como en las líneas celulares

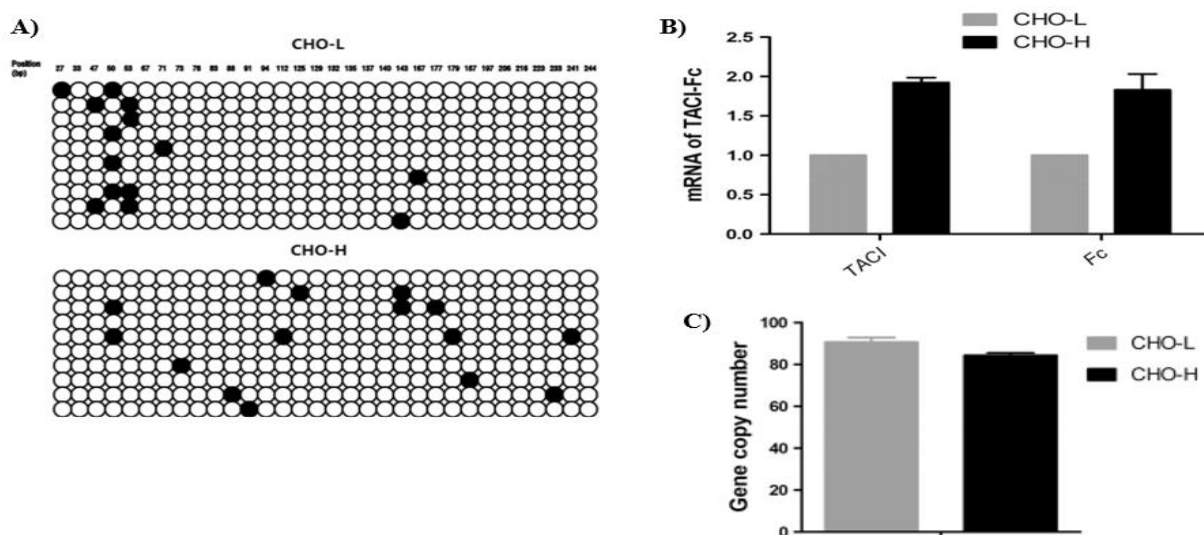
parentales, incluso después de múltiples rondas de clonación. Esto indica que la variabilidad celular es una característica inherente y no surge solamente como resultado de la carga metabólica impuesta por la expresión heteróloga (Browne & Al-Rubeai, 2007).

### **3.2 – Heterogeneidad de las células CHO**

En un estudio multiómico realizado por Laskshmanan et al. (2019) entre múltiples líneas parentales de células CHO, se observó variaciones en la tasa de crecimiento específica, rendimiento de nutrientes en células y producto, patrones de glicosilación de proteínas y cambio en la expresión de proteínas y enzimas críticas de vías metabólicas. Tal variación probablemente se deba a la inestabilidad cromosómica de las células CHO (Wunr & Hacker, 2011) como: variantes de secuencia, inserciones, deleciones, inversiones y mutaciones puntuales, así como reordenamientos cromosómicos con pérdida, duplicación de cromosomas completos, pérdida de copias de genes y polimorfismos de un solo nucleótido (Vcelar et al., 2017; Yoshikawa et al., 2000; Cartwright et al., 2016). La heterogeneidad celular también puede deberse a eventos epigenéticos responsables del patrón de expresión de las células, como la metilación del ADN y/o de las histonas. En conjunto, todo lo anterior determina la respuesta celular en cuanto a crecimiento, metabolismo, producción y calidad de la proteína de interés; afectando atributos del producto deseado estabilidad, solubilidad, farmacodinámica y farmacocinética (Sissolak et al., 2019).

Para dilucidar la diferencia entre dos clones de células CHO con alta y baja productividad, Chen et al. (2019) realizaron un estudio transcriptómico donde determinaron que más de 600 genes se expresan de forma diferencial, observando la mayor expresión en genes involucrados en la organización de los cromosomas, en los arreglos de cromatina, procesamiento del ARN y en el transporte de proteínas. Sin embargo, en ningún momento se preguntan si esta diferencia en el transcriptoma se debe a una marca epigenética global que repercuta en un mayor o menor silenciamiento de estos genes claves para la producción de la proteína de interés. En cambio, analizaron únicamente el grado de metilación del promotor del

transgén para las clonas con alta y baja productividad (**Fig. 1A**), donde no encontraron una diferencia significativa en el porcentaje de citocinas metiladas. Interesantemente, el nivel del ARN mensajero del transgén es mayor para la clona altamente productora (**Fig. 1B**), a pesar de que ambas clonas presentan el mismo número de copias del transgén (**Fig. 1C**). Estos resultados indican que la respuesta celular depende en gran medida de la regulación de muchos genes que contribuyen a su alta o baja productividad y a la fina combinación de sus niveles de expresión, dado por uno o varios elementos epigenéticos.



**Figura 1. Diferencias entre clonas de células CHO con alta y baja productividad.** A) Región promotora del transgén. Los círculos blancos corresponden a citosinas libres y los círculos negros a citocinas metiladas. Cada línea horizontal de círculos corresponde a una célula distinta, para un total de 10 repeticiones. No hubo diferencia significativa en cuanto al porcentaje de citosinas metiladas. B) Nivel de expresión del ARNm del transgén. C) Número de copias del transgén en el genoma. Modificado de Chen et al, 2019.

### 3.3 – Epigenética y metilación del ADN en células CHO

La epigenética describe los mecanismos mediante los cuales la expresión de genes está controlada a través de modificaciones covalentes sobre el ADN, ARN, ARN pequeños y largos no codificantes o histonas sin alterar el código genético (Gibney & Nolan, 2010). Estas controlan indirectamente la expresión, al permitir la unión de factores de transcripción a la región promotora de los genes (Amini *et al.*, 2019), a

regiones potenciadoras río arriba (Gibney y Nolan, 2010; Wipperman & Noll, 2017), y también mediante ARN pequeños no codificantes que impiden la traducción del ARN mensajero (Wahid *et al.*, 2010).

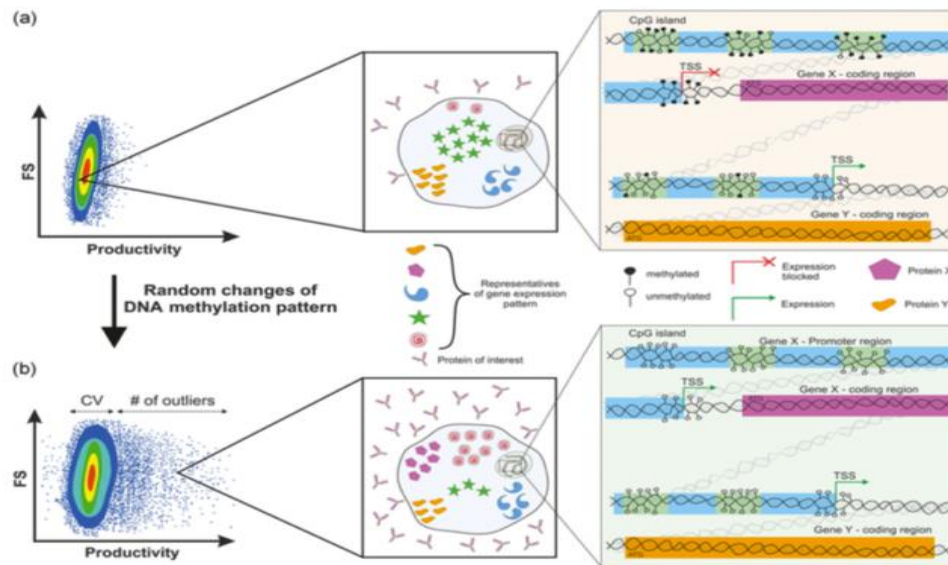
Dentro de todas las marcas epigenéticas, la metilación del ADN en dinucleótidos CpG es uno de los factores más importantes en la regulación de la expresión (Weinguny *et al.*, 2020). Aquí, las ADN metiltransferasas (DNMT) son las enzimas encargadas de adicionar un grupo metilo al carbono 5 de la citosina, cuya presencia, produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN que actúa como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación, o bien, impiden la unión de factores de transcripción (Amini *et al.*, 2019). En células de mamífero se han identificado tres enzimas diferentes que llevan a cabo esta reacción y se han clasificado en dos grupos: las DNMT1 o de mantenimiento que actúan durante la fase S del ciclo celular y las DNMT3A y DNMT3B o *de novo* durante el establecimiento de patrones de metilación del ADN específicos para cada tipo de célula germinal o somática durante el desarrollo (Sharif & Koseki, 2018; Wippermann *et al.*, 2015; Schneider, *et al.*, 2013; Attwood *et al.*, 2002).

Los primeros estudios de metilación del ADN en células CHO se centraron en la metilación de genes y promotores recombinantes, demostrando una correlación entre el estado de metilación del ADN y la expresión o estabilidad de la producción de genes recombinantes (Wipperman & Noll, 2017). Además, se ha observado que el patrón de metilación del ADN en células CHO, cambia durante la adaptación a nuevas condiciones de cultivo o cuando la línea celular se está seleccionando con base en características deseables, pero una vez establecido este patrón de metilación sobre el ADN después de múltiples rondas de selección, permanece relativamente constante con el paso generacional. Esto demuestra que la metilación del ADN actúa como una herencia estable a largo plazo a diferencia de otras marcas epigenéticas como en las histonas, cuyo cambio es rápido y reversible ante las condiciones ambientales del momento (Weinguny *et al.*, 2020; Feichtinger *et al.*, 2016 Hernández *et al.*, 2019).

En 2017 Wipperman y colaboradores realizaron el análisis de regiones metiladas diferencialmente de islas CpG de regiones promotoras en el ADN y

mostraron que varios genes se vieron afectados 24 horas después de la adición de butirato, un compuesto conocido por mejorar la productividad celular específica en células CHO y que conduce a alteraciones de los eventos de silenciamiento epigenético (Wipperman *et al.*, 2013). Esto es resultado de una hiper-acetilación de las histonas al inhibir la enzima histona desacetilasa (HDAC por sus siglas en inglés), jugando un papel crucial en el rearreglo de la cromatina y de la actividad transcripcional de la célula (Cuisset *et al.*, 1997). Los genes que se encontraron asociados con islas CpG metiladas diferencialmente fueron algunos que participan en la biosíntesis de proteínas, muerte celular, metabolismo del ADN, transcripción, procesos de desarrollo, metabolismo de fosfato, señalización y transporte, además de marcas de metilación en sitios de unión a factores de transcripción específicos. (Wipperman *et al.*, 2017). A pesar de que la desacetilación de histonas es llevada a cabo por enzimas diferentes a las DNMT, se ha observado que la metilación del ADN da como resultado el reclutamiento de histonas (HDAC) a las regiones promotoras, reprimiendo así la expresión de genes (Sarkar *et al.*, 2011).

Weinguny *et al.* (2020) se preguntaron cómo el cambio en el perfil de metilación del ADN podría afectar la productividad de 3 clonas de células CHO. Para ello emplearon ARN de interferencia para inhibir a la DNMT1, bajo el supuesto que una hipometilación del genoma, cambiaría el patrón de expresión de la célula y, en consecuencia, diversificaría la población celular con respecto a su productividad debido a la expresión de genes antes silenciados por metilación (**Fig. 2**).

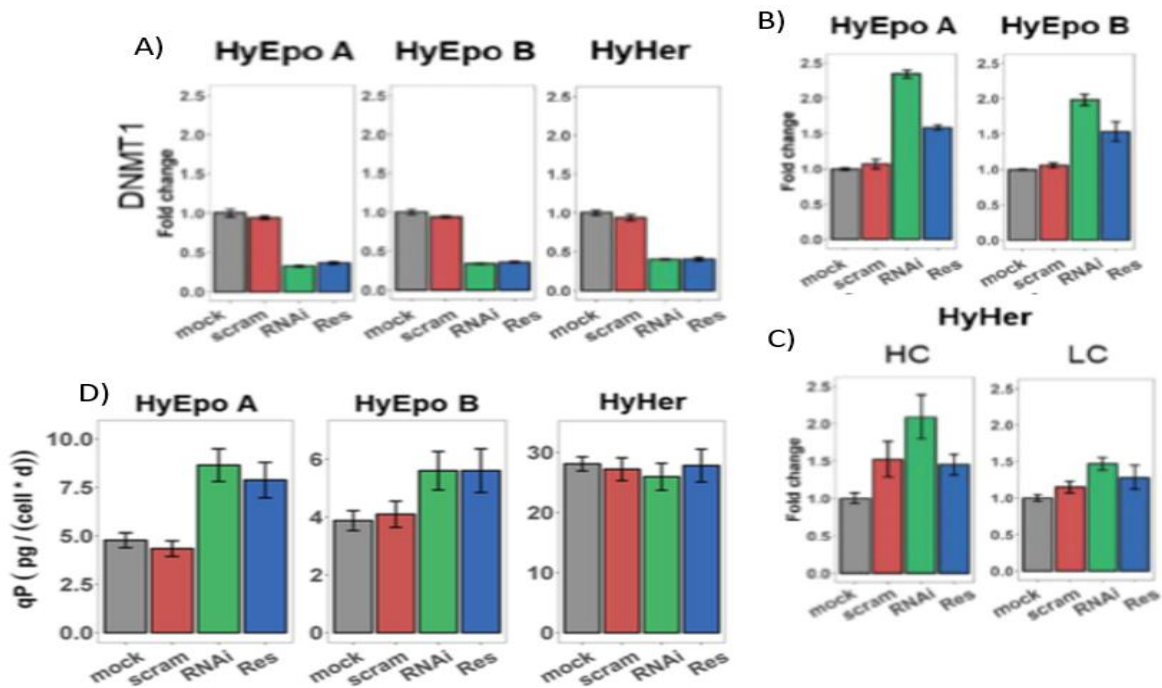


**Figura 2. Cambio en el patrón de expresión ante cambios aleatorios en el patrón de metilación de células CHO.** (a) Población productora antes de inducir cambios en el patrón de metilación del ADN. El primer cuadro ampliado muestra un ejemplo de la expresión hipotética de genes. El cuadro ampliado de lado derecho indica el caso donde un gen X se encuentra silenciado por metilación en su región promotora, mientras que el gen Y está activo. (b) Población productora después de un cambio en el patrón de metilación del ADN muestra un mayor número de células atípicas con mayor productividad situadas a la derecha de la población principal y también bajas productoras a la izquierda. El primer cuadro ampliado muestra una mayor producción del producto recombinante debido al cambio en su patrón de metilación. Modificado de Weinguny y colaboradores, 2020.

Weinguny et al. (2020) trabajaron con tres clones de células CHO: dos de ellas, HyEpo A e HyEpo B, fueron diseñadas para producir una proteína fusionada con eritropoyetina humana, mientras que la tercera, HyHer, era una clona comercial productora de un AcM modelo. En la **Fig. 3** se muestra el efecto del silenciamiento de la DNMT1 en la productividad de las tres clonas. Interesantemente, hubo un incremento en la expresión del transgén, pero en términos de su productividad específica, únicamente hubo un incremento significativo en las clonas HyEpo A e HyEpo B. Discuten los autores que esto se debe a que HyHer ya era una clona establecida como alta productora, después de múltiples rondas de selección. Como consecuencia ya estaba adaptada con una transcripción eficiente del gen de interés, así como un patrón de expresión favorable a diferencia de HyEpo A e HyEpo B, que



se encontraban en una etapa temprana del proceso donde su transcriptoma estaba lejos de ser el más eficiente para la producción.



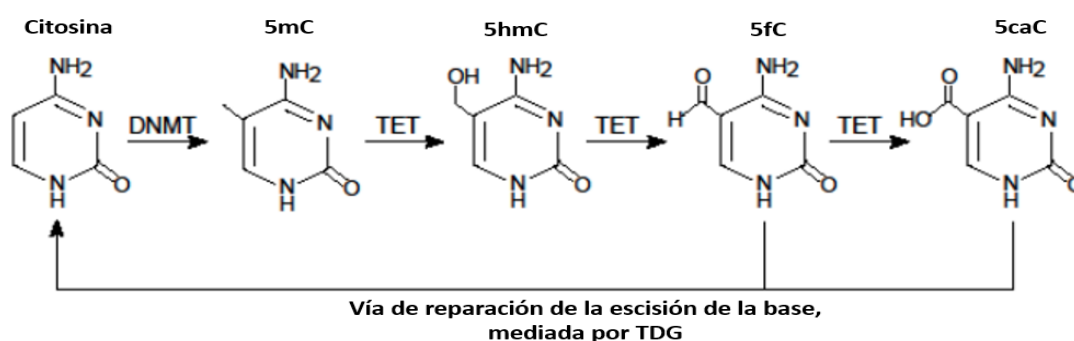
**Figura 3. Efecto de la inhibición de la DNMT en la productividad de clones de células CHO.** A) Disminución de la expresión de la DNMT1 en las clonas estudiadas B) Aumento del ARN mensajero para las clonas HyEpoA e HyEpoB C) Aumento del ARN mensajero de la clona HyHer. D) Cambio en la productividad específica. Modificado de Weinguny et al., 2020.

Estos hallazgos sugieren que la metilación del ADN juega un papel previamente subestimado, pero realmente importante en la definición del comportamiento celular de las clonas de producción. Además, detonan la pregunta de cómo la metilación podría impactar la heterogeneidad celular en cuanto al metabolismo y calidad del producto de interés, variables poco estudiadas en la literatura.

### 3.4 – Mecanismos de metilación y desmetilación del ADN

Los factores clave que controlan e interpretan la metilación y desmetilación del ADN son los llamados lectores epigenéticos, los cuales comprenden un conjunto de familias de enzimas diferentes, como las metiltransferasas de ADN (DNMT1,

DNMT3A y DNMT3B) y una proteína relacionada sin actividad catalítica (DNMT3L). El mecanismo de acción de las DNMT consiste en posicionar su sitio activo en la citosina de la doble hélice. Ahí se forma un enlace covalente, lo que aumenta la carga negativa en el átomo C5 y conduce a la adición de un grupo metilo de la molécula donante de S adenosil metionina (SAM) (Wipperman & Noll, 2017). Por otro lado, estas marcas de metilación del ADN se pueden eliminar mediante otra familia de enzimas llamadas translocación-diez-once (TET, por sus siglas en inglés) metilcitosina dioxigenasas que tienen la función de modificar la 5-metilcitosina mediante su oxidación a 5 hidroximetilcitosina (5hmC) y luego a 5 formil citosina (5fC) y 5 carboxil citosina (5caC) (**Figura 4**). La restauración de la citosina no metilada se basa entonces en la acción de la timina ADN glicosilasa (TDG) que es capaz de escindir el carboxilo de las bases 5fC y 5caC (Wipperman & Noll, 2017).



**Figura 4. Modificación y restauración de citosina mediante DNMTs, TET y TDG.** Modificado de Wipperman & Noll, 2017.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1 – Métodos de selección para líneas celulares de mamíferos y su impacto en la heterogeneidad.

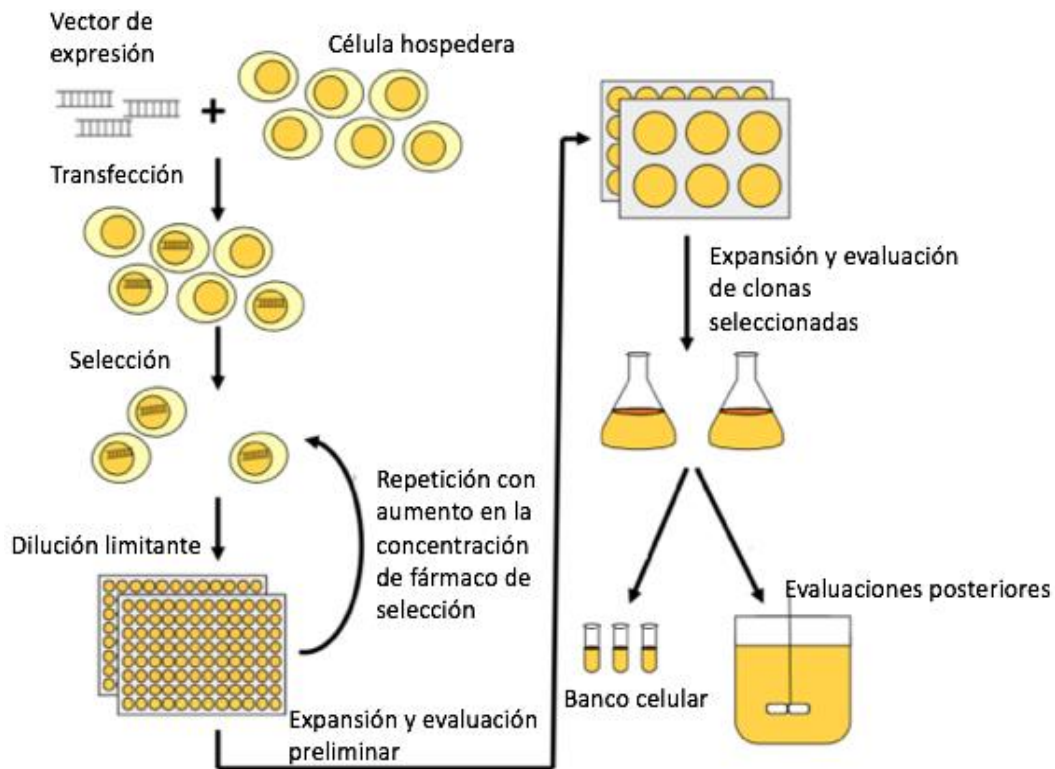
La selección de líneas celulares de mamíferos de alta producción representa uno de los puntos medulares, pero también el cuello de botella en el desarrollo de procesos para la producción de biofarmacéuticos. Los métodos tradicionales requieren mucho tiempo y están significativamente limitados por la cantidad de clonas que pueden seleccionarse (Browne & Al-Rubeai, 2007).

Actualmente el desarrollo de líneas celulares utilizadas por la mayoría de las compañías biofarmacéuticas, se basan en la tecnología de amplificación por metotrexato (MTX) (Chusainow et al., 2008) o en el sistema de glutamina sintetasa (GS) (Noh et al., 2018). Ambos sistemas utilizan un fármaco específico para inhibir una enzima esencial para el metabolismo de la célula: el MTX inhibe a la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la metionina sulfoximina (MSX) inhibe a la GS (Chusainow et al., 2008; Lai et al., 2013; Noh et al., 2018;). La DHFR convierte el dihidrofolato en tetrahidrofolato, una lanzadera de grupo metilo requerida para la síntesis de novo de purinas, ácido timidílico y ciertos aminoácidos. Por otra parte la GS cataliza la ligadura dependiente de ATP de amoníaco y glutamato a glutamina.

Después de la transfección con vectores de expresión que contienen los casetes para la proteína recombinante y los genes marcadores de selección, las células se cultivan en presencia del fármaco de selección (MTX o MSX), aumentando gradualmente su concentración para aumentar la presión selectiva y por ende la productividad de proteína recombinante (Lai et al., 2013). En el proceso de clonación se utilizan métodos como la dilución limitante (**Figura 5**), para garantizar el aislamiento de células individuales con altas tasas de producción.

En 2010 Yang et al. realizaron un estudio sobre cuatro clonas productoras de un anticuerpo monoclonal sujetas a distintas condiciones de cultivo y, determinaron cuales condiciones cómo estas afectan el grado de metilación del genoma y, además, cómo repercuten en la cantidad de proteína recombinante medida en picogramos por célula por día. Encontraron que como estas clonas, teóricamente

iguales, estaban sujetas a variaciones genéticas que a su vez repercutían en su fisiología y en el nivel de producción de la proteína heteróloga.



**Figura 5. Proceso típico para desarrollar una línea celular para la fabricación de proteínas recombinantes.** Las clonas celulares con una alta concentración de proteína recombinante se eligen para expansiones progresivas antes del almacenamiento criogénico y otras evaluaciones, como la estabilidad de la producción y la calidad de proteína recombinante. Modificado de Lai et al, 2013.

Para mejorar la productividad de proteína recombinante, entre otros esfuerzos se han optimizados las condiciones de cultivo, desarrollado medios de cultivo y sistemas de expresión, modificado genéticamente las células productoras y amplificado genes diana en sitios específicos en el genoma mediante CRISPR-Cas (Dovgan et al., 2021; Dangi et al., 2018; Kawabe *et al.*, 2011) o con elementos reguladores como “insulators” que mejoran la producción de la proteína de interés (Naderi et al., 2018) Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre la influencia de la heterogeneidad genética heredada en los rasgos fenotípicos y el potencial de producción desde el punto de vista del bioprocesamiento.

Vishwanathan y colaboradores (2014) demostraron que durante la amplificación del gen de interés y selección de la línea celular productiva se busca

no solo aumentar las copias del gen de interés en el genoma sino también mejorar el manejo energético incrementado debido al aumento en la producción de la proteína heteróloga.

El ajuste preciso de diferentes parámetros en el desarrollo de una línea celular, como el medio utilizado durante la clonación, las condiciones de cultivo, el agente de selección u otras herramientas de selección utilizadas tiene un impacto en las clonas que se generan. Estos factores pueden contribuir a la alta diversidad en el comportamiento de las clonas que se observa incluso entre la misma población o entre las subclonas derivadas (Weinguny *et al.*, 2020).

Además, un problema fundamental que existe en esta y todas las posibles técnicas de clonación y selección, es el error metodológico de aislar una única célula para su amplificación. Esto significa que una población clonal teóricamente idéntica puede, por error, provenir de más de una célula siendo un factor importante en aumentar la heterogeneidad. De ahí la importancia del uso correcto y mejoramiento de estas técnicas (Lai *et al.*, 2013).

## **4.2 – Metabolismo de células CHO**

Los estudios de Wahrheit y colaboradores (2014) proponen que existen tres estadios metabólicos según la fase de crecimiento en la que se encuentran las células:

1. La fase de crecimiento exponencial es donde existe un metabolismo de desperdicio con exceso de glicólisis y glutaminólisis, que resulta en la producción de grandes cantidades de lactato y amonio excretado y un transporte variable de piruvato hacia el interior de la mitocondria. El ciclo de Krebs es entonces alimentado por el  $\alpha$ -cetoglutarato, producto de las enzimas citosólicas glutamato deshidrogenasa (GLDH) y la glutaminasa (Glnase), a partir de la glutamina (Wahrheit *et al.*, 2014). En este punto, la glutamina también puede ser metabolizada a malato, que es transportado al exterior de la mitocondria donde la enzima málica lo utiliza para formar piruvato. Es por esta razón que durante las primeras etapas del cultivo hay un consumo elevado de la glutamina.

2. La segunda fase o de metabolismo balanceado ocurre cuando el flujo glicolítico iguala al flujo del ciclo TCA y las células, luego de haber consumido la mayor parte de la glucosa y glutamina disponible, utilizan como sustratos a la glucosa restante y el lactato producido, formando piruvato (Wahrheit et al. 2014).

3. La fase de mantenimiento, donde se consumen el lactato y la alanina antes producidos. En las dos últimas fases, el flujo metabólico del ciclo TCA se mantiene igual y solo disminuye el flujo glicolítico debido a la limitación de glucosa (Wahrheit et al. 2014).

### **4.3 – Proteínas recombinantes**

Desde 2002 ha habido más de 300 aprobaciones biofarmacéuticas de la FDA (Administración de drogas y comida, por sus siglas en inglés) (Tihanyi & Nytray, 2021). El mercado de productos biofarmacéuticos se valoró en 2018 en 214, 000 millones de euros, lo que refleja principalmente la fabricación de proteínas farmacéuticas recombinantes, como anticuerpos y vacunas (Huebbers, & Buyel, 2021). Con la creciente demanda de productos bioterapéuticos en el mercado, el tiempo y los gastos se están convirtiendo en factores importantes en el proceso de fabricación.

La terapia basada en proteínas terapéuticas ha cambiado la faz de la medicina moderna en las últimas décadas, y continúa proporcionando terapias innovadoras y efectivas para numerosas enfermedades previamente refractarias (Wurn, 2004). Estas proteínas generalmente se sintetizan mediante el cultivo a gran escala de células genéticamente modificadas, que albergan genes transfectados que codifican para la proteína de interés. Es de suma importancia considerar diferentes factores que van a determinar si la proteína es efectiva o no, por ejemplo: el plegamiento adecuado y las modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Wingfield, 2015). Sin embargo, las demandas del mercado altamente competitivo cada vez mayor aún requieren que las células sean más altamente productivas y que se cultiven en biorreactores a densidades celulares más altas bajo rigurosos esquemas de optimización (Kim et al., 2011).

### 4.3.1 – Glicosilación

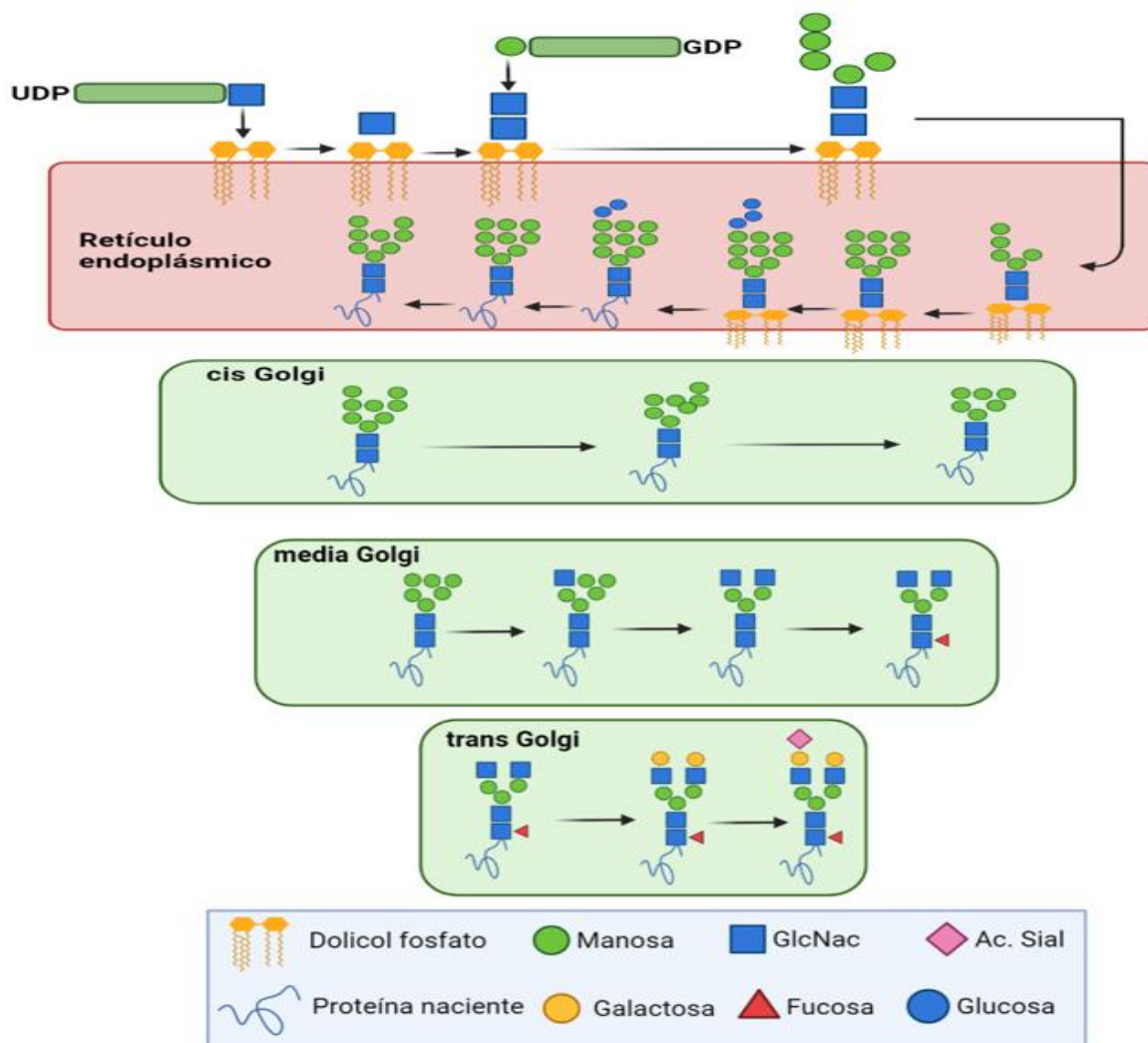
La glicosilación es el proceso enzimático característico para cada tipo de célula y tejido que consiste en la adición secuencial y organizada de carbohidratos a secuencias consenso de las proteínas, lípidos y ARN mediante enlaces covalentes (Clausen et al., 2017). La glicosilación está presente desde bacterias hasta organismos superiores (Schwarz & Aebi, 2011). Estas uniones covalentes del carbohidrato en aminoácidos específicos de la proteína determinan el tipo de glicosilación, que, entre otras, puede ser N-glicosilación cuando el oligosacárido está unido a una asparagina en una secuencia consenso. Típicamente los *N*-glicanos son más grandes que los *O*-glicanos, que se unen a través de una serina, treonina o hidroxilisina (Goh & Ng, 2017). Dada la localización de los carbohidratos en la superficie de las proteínas, no es de sorprender que tengan un efecto significativo en las propiedades fisicoquímicas, como estabilidad y solubilidad y en las propiedades biológicas del producto de interés, como es el caso de la inmunogenicidad y respuesta efectora de los anticuerpos (Arnold et al. 2007).

### 4.3.2 – *N*-glicosilación

La glicosilación de proteínas ligada a asparagina es una modificación postraduccional fundamental y extensa, que se presenta en los tres dominios de la vida (Nothaft & Szymanski, 2013; Jarrell et al, 2014; Dell et al., 2010), e involucra una gran variedad de enzimas citoplasmáticas y transmembranales presentes a lo largo de la vía secretora del retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (AG) (Hidalgo, 2010).

La *N*-glicosilación inicia con el ensamblaje secuencial de azúcares (**Figura 6**), en la cara citoplasmática del RE, donados por nucleótidos activadores para la síntesis de un *N*-oligosacárido precursor unido a dolicol fosfato (Man<sub>5</sub>GlcNac<sub>2</sub>-P-P-dol). Una vez ensamblado, una flipasa se encarga de internalizar el precursor hacia el lumen del RE (Dell et al., 2010). Posteriormente el *N*-oligosacárido se transfiere en bloque a la proteína aceptora naciente en un paso catalizado por la enzima oligotransferasa (OST) a un residuo de Asn dentro la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr,

donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Schwarsz & Aebi, 2011). Inmediatamente después es procesado por glucosidasas y manosidasas hasta producir un glicano con alto contenido de manosa ( $\text{Man}_8\text{NaGlc}_2$ ) que será exportado hasta AG para posteriores ramificaciones con azúcares como: N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico (Hidalgo, 2010).

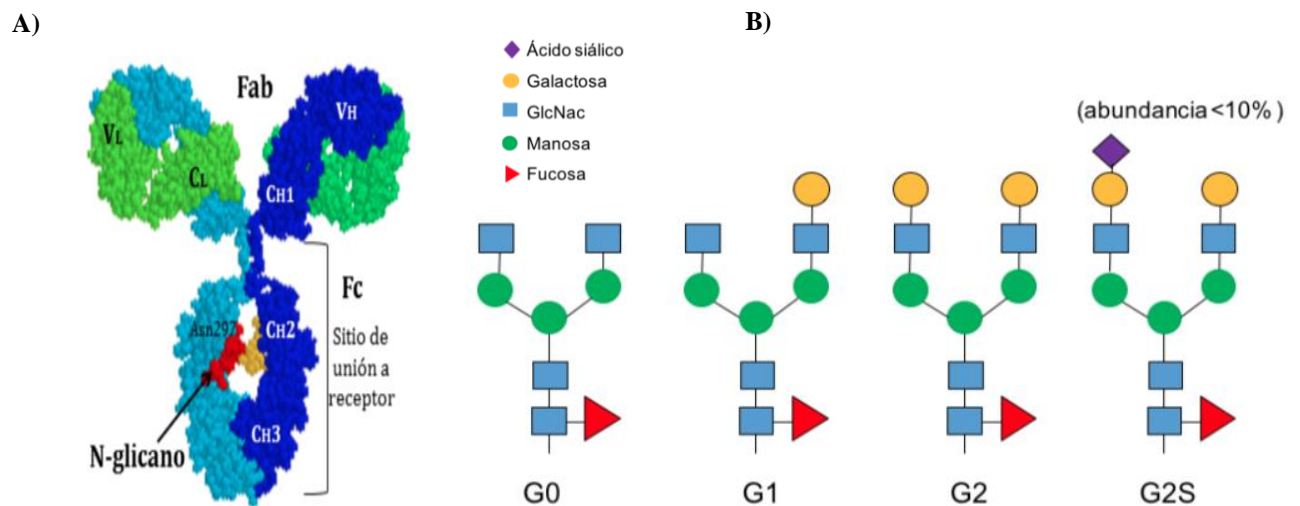


**Figura 6. Biosíntesis resumida de glicanos de proteínas secretadas en células de humano.** La N-glicosilación se inicia con la síntesis de un glicano precursor  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNa}_2\text{-PP-dol}$  que luego se une a los residuos de asparagina de proteínas nacientes como parte de una modificación postraduccional. Luego las proteínas propiamente plegadas se trafican al aparato de Golgi donde una serie de enzimas procesan el glicano para formar una población heterogénea de glicoproteínas. Modificado de Goh & Ng, 2017.



### 4.3.3 – Estructura y glicosilación de inmunoglobulinas humanas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoconjugados expresados en todos los mamíferos y se han distinguido cinco clases, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, las cuales difieren en cuanto a tamaño, aminoácidos y composición de carbohidratos en la cadena pesada. En particular, los IgG, contienen dos cadenas pesadas aproximadamente de 50 kDa cada una y dos cadenas ligeras de aproximadamente 25 kDa, las cuales se pliegan en tres dominios, dos fragmentos Fab (fragmento de unión) y un fragmento Fc (fragmento cristalizante) (Schroeder & Cavacini, 2010). Presentan un sitio muy conservado de N-glicosilación en la asparagina 297 (Asn-297) en el dominio Fc, específicamente en el dominio dos de la región constante de la cadena pesada (CH2) (**Fig. 7A**). Al agrupar a los glicanos más abundantes presentes IgG de acuerdo con el número de galactosas terminales, se puede identificar tres tipos de estructuras mayoritarias: sin galactosa terminal (G0), con una (G1) o con dos galactosas terminales (G2) (**Fig. 7B**) (Zúñiga, 2017).



**Figura 7. Estructura de las inmunoglobulinas tipo IgG y de su N-oligosacárido.** A) Cadenas pesadas señaladas en azul y cadenas ligeras en verde. Fab: Fracción de unión a un antígeno, Fc: Fracción cristalizante. Se indica la posición de la Asn297 en la CH2 de la región Fc donde se da la unión al N-glicano. B) N-glicanos característicos de los AcM humanos. (Modificado de Zúñiga, 2017 y Raiu, 2008).

La glicosilación juega un papel importante para la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) mediante la modulación de la unión al receptor Fcγ (Zheng et al., 2011). Se ha observado que la fucosilación, la galactosilación terminal y la presencia de ácido siálico pueden impactar en la unión de FcγRIIIa, en la ADCC, en la unión de C1q y de FcRn así como en su estabilidad térmica y propensión a agregarse (Wada et al., 2018).

Por otro lado, los AcM desglicosilados exhiben menos estabilidad térmica para el dominio CH2 y menos resistencia al despliegue inducido por el cloruro de guanidino, un ácido débil capaz de provocar que las proteínas pierdan su estructura ordenada. Además de esto, la pérdida del oligosacárido en los AcM hace que sean más susceptibles a la edición proteolítica por papaína y mayores tasas de agregación (Zheng et al., 2011).

Los AcM tienen diversas aplicaciones en distintas áreas como son la investigación biomédica, diagnóstico, catálisis, producción de biosensores y particularmente en terapia en la que han revolucionado el tratamiento de muchas enfermedades (NRC, 1999; Tabll, 2015; Sharma et al, 2016; Singh et al., 2017). Los AcM se pueden manipular para conferirles propiedades efectoras y de reconocimiento diferentes a las originales, aumentando su eficiencia y minimizando su inmunogenicidad (Hidalgo, 2010). Por ello no resulta extraño que en 2016 las ventas de estos productos (sin contar las vacunas) alcanzaron \$163 mil millones de dólares, un aumento del 5.8% desde 2015. El informe “Global Protein Therapeutics Market Outlook 2020” estima que este mercado puede alcanzar los \$208 mil millones de dólares para fines de ese año (Kesik-Brodacka, 2017).

## **V. Justificación**

La alta demanda de proteínas terapéuticas como los AcM, eleva la necesidad de optimizar la producción de líneas recombinantes de células CHO que, frecuentemente, requiere tiempo y un alto costo debido a la heterogeneidad poblacional. Entender las causas de esta diversidad, como por ejemplo la metilación del ADN, puede ser útil para encontrar los factores claves que favorezcan la producción y de esta forma, hacer más eficiente el diseño y selección de líneas celulares estables y productoras.

## **VI. Hipótesis**

La hipometilación aleatoria en el ADN provoca cambios en la fisiología y metabolismo de subclonas de células CHO recombinantes, contribuyendo a su heterogeneidad e incrementando la producción del anticuerpo monoclonal sin alterar su calidad.

## **VII. Objetivos**

### **7.1 – Objetivo general**

Determinar la heterogeneidad en el comportamiento cinético y metabólico, así como la producción y calidad de un anticuerpo monoclonal recombinante modelo secretado por cuatro sub clonas de células CHO, y evaluar si tal heterogeneidad está relacionada al nivel de metilación de su ADN.

### **7.2 – Objetivos específicos**

1. Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de cuatro subclonas de células CHO, seleccionadas de un mismo proceso de transfección, para caracterizar cuantitativamente su crecimiento y consumo y producción de metabolitos.

2. Caracterizar la cinética de producción de un AcM modelo y determinar su patrón de *N*-glicosilación para cada una de las cuatro subclonas de células CHO seleccionadas.
3. Seleccionar dos subclonas de mayor interés para determinar el grado de metilación de sus genomas, tanto antes como después de someterlas a un tratamiento enzimático de hipometilación aleatoria del ADN.
4. Determinar el efecto de la hipometilación aleatoria del genoma de dos subclonas de células CHO seleccionadas sobre sus características cinéticas y metabólicas, así como las de producción y calidad del AcM secretado.

# VIII. Materiales y métodos

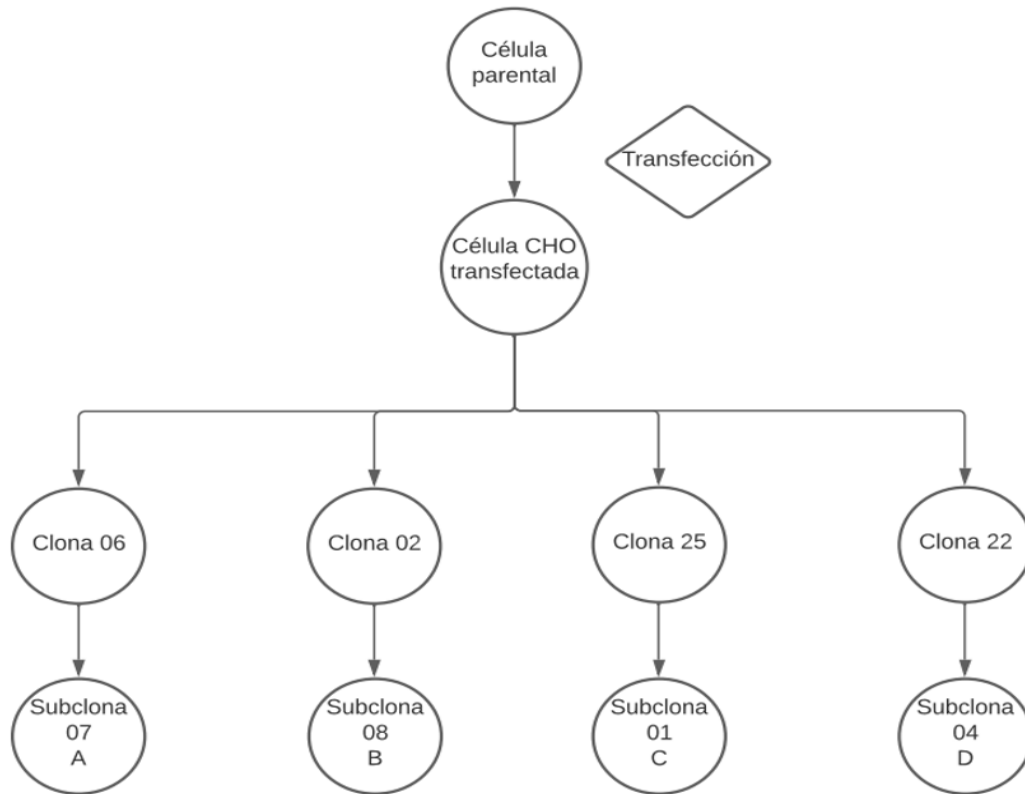
## 8.1 – Estrategia general

Se seleccionaron cuatro sub clonas de células CHO generadas en un mismo evento de transfección para la producción de un AcM recombinante de una tecnología desarrollada en nuestro grupo de investigación y transferida a laboratorios Liomont S.A. de C.V. Inicialmente, las cuatro subclonas fueron exhaustivamente caracterizadas en términos de su cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de desechos metabólicos, así como la producción y patrón de N-glicosilación del AcM secretado. A partir de esta información se seleccionaron las dos subclonas que mayores diferencias presentaban entre sí en cuanto a la producción del AcM. Posteriormente, con la finalidad de determinar si la metilación ejerce un papel importante en las diferencias de las subclonas seleccionadas, éstas se cultivaron en presencia de un inhibidor de la DNMT que provoca una hipometilación aleatoria en el ADN. Se determinó el efecto de este inhibidor sobre los parámetros medidos con anterioridad.

## 8.2 – Estrategia particular

### 8.2.1 – Historia de las sub clonas

Las cuatro subclonas estudiadas en este trabajo, llamadas para fines prácticos y por confidencialidad como: A, B, C y D, fueron proporcionadas por los laboratorios Liomont SA de CV a partir de una célula CHO parental diseñadas para la producción de IgG1 humano (**Figura 8**). En trabajos previos en nuestro laboratorio se determinó que éstas eran las mejores clonas en términos de productividad y calidad en relación con el AcM modelo.



**Figura 8. Historia celular de las clonas estudiadas.** Proporcionadas por los Laboratorios Liomont SA de CV.

### 8.2.2 – Cultivo y mantenimiento celular

Las células se cultivaron en matraces de 125 mL en 30 mL de medio Cellvento™ suplementado con 6 mM de L-glutamina en una incubadora humidificada a agitación constante (130 rpm), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se contaron cada 48 a 72 h y se realizó el subcultivo según fue necesario para que la concentración inicial celular fuera 0.5 x 10<sup>6</sup> cel / mL.

Para subcultivar las células, se utilizó la siguiente fórmula para determinar el volumen de inóculo y el volumen de medio fresco durante el subcultivo.

$$V_c = \frac{(X_d)(V_o)}{X_0} \quad (1)$$

donde  $V_c$  es el volumen de inóculo,  $X_d$  es la concentración deseada de células.  $V_o$  es el volumen final y  $X_o$  es la concentración de células viables.

$$V_m = V_o - V_c \quad (2)$$

donde  $V_m$  es el volumen de medio fresco a añadir.

### 8.2.3 – Bancos celulares

Las clonas A, B, C y D fueron descongeladas a partir de bancos de células maestros (BCM) preexistentes en el laboratorio, cada uno en diferente número de pase. Para cada una de las subclonas se hizo un banco de trabajo independiente en el pase número 10 y todas las mediciones subsecuentes se realizaron en el pase número 13. En la Tabla 1 se muestran las características de cada uno de los bancos preexistentes.

**Tabla 1. Bancos de células maestros.** Características de los bancos celulares de los que se partió.

Clona	Número de pase	Células totales por vial
A	8	$1 \times 10^7$
B	6	$1 \times 10^7$
C	10	$1 \times 10^7$
D	3	$1 \times 10^7$

### 8.2.4 – Criopreservación y descongelamiento

La criopreservación es un proceso que permite conservar un cultivo durante un tiempo prolongado al detener efectivamente el metabolismo celular mediante la disminución de su temperatura a  $-196^\circ\text{C}$  en atmósfera de nitrógeno líquido.

Para establecer un banco de células de trabajo (BCT) eficaz con una alta recuperación de células viables, las células se expandieron hasta fase de crecimiento logarítmico al momento de su criopreservación. Para calcular el número de células necesarias (mL) considerando  $1 \times 10^7$  cel / mL de suspensión celular por criovial se usó la siguiente fórmula:

$$N_c = \left(1 \times 10^7 \frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) \times V_t \text{ (mL)} \quad (3)$$

donde  $N_c$  es el número de células y  $V_t$  es el volumen total del medio de criopreservación considerando 1 ml por vial a preparar. Para calcular el volumen de células (mL) se usó la siguiente fórmula:

$$V_c = \frac{N_c}{X_0} \quad (4)$$

donde  $V_c$  es el volumen de células.

El volumen requerido de células se centrifugó a temperatura ambiente a 800 rpm durante 5 min. Se retiró el exceso de medio acondicionado en un tubo estéril y se guardó en un recipiente con hielo. Simultáneamente se preparó el medio de congelación tomando el volumen total, mezclando 45% de medio acondicionado, 45% de medio fresco y 10% de DMSO.

Se resuspendió lenta y completamente el sedimento celular en el medio de congelación preparado. Rápidamente se alicuotaron en crioviales preparados (1 mL por vial) que fueron guardados durante al menos 24 h a  $-80$  °C antes de pasarse a nitrógeno líquido.

La descongelación se realizó rápidamente (aprox. en 2 min) colocando los viales que contienen la suspensión celular congelada en un baño de agua a  $37$ °C. Es importante desinfectar el vial con etanol al 70% antes de abrirlo. Se prepararon 20 mL de medio suplementado con 6 mM de L-glutamina en un matraz de 250 mL en condiciones estériles. Con una pipeta estéril de 1 mL, se transfirió suavemente la suspensión celular al matraz y se incubaron las células por al menos 15 minutos



en una incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> antes de determinar su concentración y viabilidad celular.

### **8.2.5 – Determinación de la concentración celular empleando el contador de partículas Coulter Counter™.**

Se determinó la concentración celular mediante un contador Coulter Counter™ acorde al trabajo de Bulté et al., 2020. Brevemente se preparó una dilución de 1:10 de muestra en solución isotónica para cultivos descongelados o durante las primeras 24 h de cultivo. Para cultivos incubados durante más de 48 h se hizo una dilución 1:100 o más en caso de ser necesario.

A partir de los datos obtenidos del contador Coulter, que emplea 0.1 mL de muestra, se calculó la concentración celular utilizando la siguiente ecuación:

$$X_t = \frac{N}{0.1} x f d \quad (5)$$

donde  $X_t$  es la concentración celular total,  $N$  es el número partículas contadas por el equipo y  $f d$  es el factor de dilución.

### **8.2.6 – Determinación de la concentración y viabilidad celular en cámara de Neubauer.**

Para determinar la concentración y viabilidad celular en cámara de Neubauer se hizo la dilución adecuada de la suspensión celular con solución de azul de tripano al 20%. Para un cultivo que se ha descongelado o incubado durante al menos 24 h, se hicieron diluciones de 1:2 o 1:5. Para cultivos que se han incubado durante más de 48 h se hizo una dilución 1:10, 1:20 o mayor de ser necesario.

Se limpió la cámara de Neubauer y el cubreobjetos con etanol al 70% (v/v) y se secó con una toalla de papel. Se llenaron ambos lados de la cámara con suspensión celular (aproximadamente 10 µL) y se observó bajo un microscopio invertido de contraste de fase con un aumento de 10X. Se contaron el número de células viables (como células brillantes) y no viables (teñidas de azul).

A partir de los datos obtenidos de la cámara de Neubauer, se calculó la concentración de células viables, no viables y el porcentaje de viabilidad utilizando las siguientes fórmulas:

$$X_0 = \frac{Nv}{Nu} x fd x 10,000 \quad (6)$$

donde Nv es el número de células viables contadas en Nu cuadrantes. La concentración de células no viable Xn, está dada por:

$$Xn = \frac{Nm}{Nu} x fd x 10,000 \quad (7)$$

donde Nm es el número de células muertas contadas en Nu cuadrantes. Finalmente, la viabilidad, Vi se calculó como:

$$Vi = \frac{Nv}{Nt} x 100 \quad (8)$$

donde Nt es en número total de células.

### **8.2.7 – Cinéticas de cultivo**

Para tener validez estadística los cultivos se realizaron por triplicado en matraces de 500 mL con 100 mL de medio a una concentración celular inicial de  $0.5 \times 10^6$  cel / mL. Cada 24 h se tomó una pequeña alícuota para evaluar la concentración celular, viabilidad y concentración de metabolitos. Las cinéticas se terminaron cuando la viabilidad fue menor al 80%. Con los datos obtenidos se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), los rendimientos de biomasa con respecto al consumo de fuentes de carbono y nitrógeno, la generación de los metabolitos de desecho lactato y glutamato ( $Y_i$ ) y sus respectivos coeficientes ( $q_i$ ).

### **8.2.7.1 – Determinación de la velocidad específica de crecimiento en cultivo tipo lote.**

Para determinar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en la fase exponencial se utilizó la ecuación 9. La cual es la forma linealizada del modelo exponencial de crecimiento.

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu(t_f - t_0) \quad (9)$$

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento,  $t_f$  es el tiempo final y finalmente  $t_0$  es el tiempo inicial. La  $\mu$  se calculó a través de la pendiente de la regresión lineal obtenida de la gráfica de  $\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)$ , tomando únicamente los puntos de la fase exponencial.

### **8.2.8 – Cuantificación de la concentración de metabolitos**

Las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina y glutamato se determinaron enzimáticamente en un multianalizador enzimático YSI modelo 2700 acorde al método de Borja et al., 2012. Este analizador utiliza las siguientes membranas con enzimas inmovilizadas: glucosa oxidasa para determinar la concentración de glucosa, L-lactato oxidasa para la concentración de lactato, glutaminasa/L-glutamato oxidasa para la concentración de glutamina y L-glutamato oxidasa para la concentración de glutamato. Las enzimas catalizan la reacción oxidativa entre la muestra y el oxígeno, formando un derivado y peróxido de hidrógeno que es oxidado en un ánodo de platino, generando una corriente eléctrica que es linealmente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y ésta a su vez, a la concentración del metabolito medido.

### **8.2.9 – Cálculo del rendimiento de metabolitos.**

Los rendimientos de la biomasa con respecto al consumo de fuentes de carbono y nitrógeno (glucosa y la glutamina), y la formación de metabolitos de desecho (lactato y glutamato), se calcularon acorde al trabajo de Fuentes et al., 2013. Brevemente

se utilizaron los datos la pendiente en la fase exponencial de crecimiento, de la gráfica entre la concentración de células viables y el nutriente o metabolito “*r*”.

$$Y = \frac{X_f - X_i}{i_f - i_i} \quad (10)$$

donde  $X_f$  es la concentración final de células,  $X_i$  es la concentración inicial de células,  $i_f$  es la concentración final del metabolito en cuestión e  $i_i$  es la concentración inicial del metabolito.

### **8.2.10 – Cálculo de velocidades de consumo de nutrientes o generación de metabolitos secundarios**

Las tasas específicas de producción y formación se determinaron mediante la ecuación:

$$q_i = \frac{\mu}{Y} \quad (10)$$

donde  $Y$  es el rendimiento de células viables con respecto al metabolito o nutrimento de interés y  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento.

### **8.2.11– Purificación del anticuerpo mediante afinidad proteína A**

Para la purificación del anticuerpo se realizaron cultivos de igual forma que el punto 8.2.7 siguiendo la metodología de Serrato et al., 2994. Brevemente, en el punto máximo de crecimiento se recolectó el medio de cultivo con células y se centrifugó a 5000 rpm por 15min en una centrífuga Eppendorf 5810 R (Eppendorf, AG). El sobrenadante se filtró a través de membrabas Millipore™ de 0.45  $\mu\text{m}$  y luego se purificó utilizando un equipo de cromatografía de baja presión AKTA prime en una columna de Proteína A siguiendo el protocolo de la **Tabla 2**. Las condiciones de operación fueron a un flujo de 1 mL / min a 25 °C. La pureza del AcM fue analizada por SDS-PAGE al 10%.

**Tabla 2. Protocolo de purificación de AcM.** Resumen de pasos seguidos durante la cromatografía de afinidad a proteína A con una columna empacada con 5 mL de resina.

<b>Paso</b>	<b>Solución</b>	<b>pH</b>	<b>Volumen de columna</b>	<b>Volumen de buffer (mL)</b>	<b>Flujo (mL / min)</b>
Equilibrio	PBS+0.3M NaCl	7.6	8	40	0.6
Carga de muestra	-	7.7	-	Máx: 250 mg Min: 25 mg	0.6
Lavado	PBS+0.3M NaCl	7.6	5	25	0.6
Elución	Glicina 0.1M	3	10	50	0.6
Regeneración	Ácido fosfórico 150 mM		3	25	0.6

### 8.2.12 – Cuantificación de la productividad del AcM.

Se cuantificó el AcM recuperado directamente del caldo de cultivo mediante cromatografía por afinidad a proteína A utilizando la columna MabPac Protein A (Thermo Scientific). Se utilizó un detector de matriz de fotodiodos PDA (Waters) a una longitud de onda de 280 nm para su detección y cuantificación. Se utilizó buffer de fosfato de sodio (pH 7.45) como solución de equilibrio y de ácido fosfórico/ fosfato de sodio (pH 2.5) como buffer de elusión y buffer de fosfato azida de sodio para almacenamiento. Las condiciones de operación fueron a un flujo de 1 mL / min a 25 °C.

### **8.2.13 – Determinación del perfil de N-glicosilación del AcM por Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica (HILIC)**

Se determinó el patrón de N-glicosilación de los AcM producidos siguiendo la metodología descrita por Palomares *et al.*, 2003. Se utilizaron muestras purificadas mediante cromatografía de afinidad con proteína A y concentradas mediante centricones Spin-X UF™ de 15 mL con un tamaño de membrana de 100kDa. El AcM se desnaturalizó con una solución 2% SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol 1M y se digirió con 1 U de PNGasa (362185, Merck) cuya función es cortar el enlace N-glicosídico entre la asparagina y la N-acetilglucosamina en una incubación de 15 h a 37 °C. Como control interno se adicionó 0.1 nmol de maltosa.

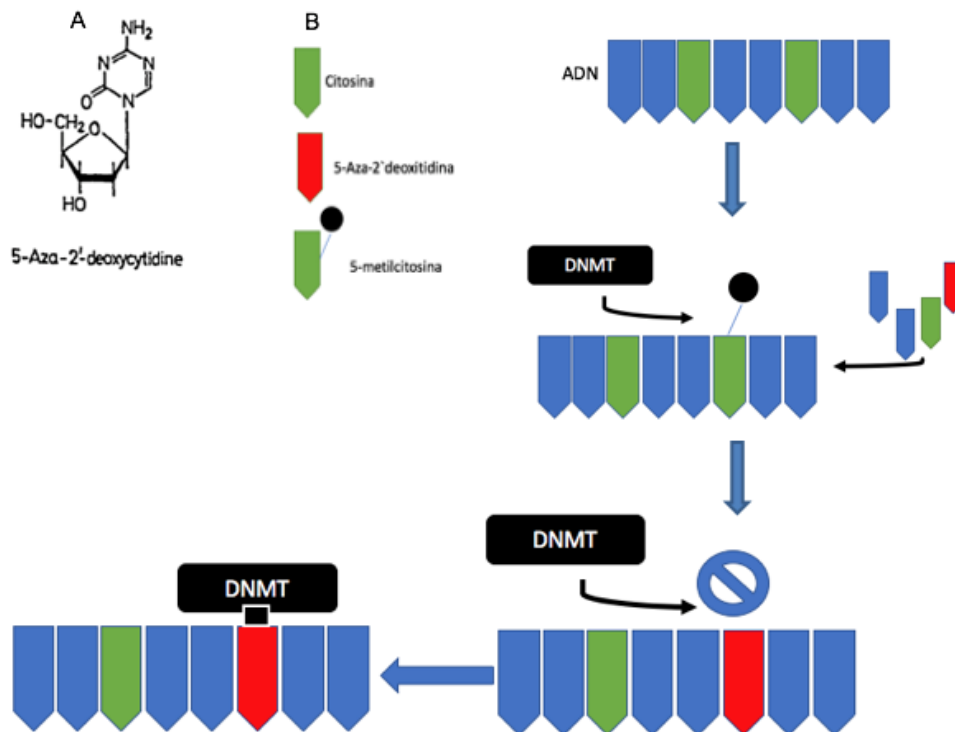
Posteriormente, los glicanos fueron derivatizados con 2-aminobenzamida (2-AB) (GKK-404, Agilent Technologies) durante 2 h a 75 °C para su detección mediante fluorescencia. Pasado el tiempo de incubación se retiró el colorante 2-AB sin reaccionar, para ello se colocaron 2 membranas de celulosa (papel Whatman No. 1) en una columna y se lavó con 1 mL de agua Milli-Q, 5 mL de ácido acético al 30% y 1 mL de acetonitrilo. Una vez completado el lavado se colocó la muestra de glicanos marcados sobre la membrana de celulosa y se lavó con 15  $\mu$ L de acetonitrilo al 100%. Se dejó absorber por 15 min y luego se lavó de nuevo con 100  $\mu$ L de acetonitrilo al 100% seguido de 5 mL de acetonitrilo al 96%. Por último, se eluyeron los glicanos con 2 mL de agua grado Milli-Q para su concentración en el equipo Savant Speed Vac™.

Para su análisis se utilizó un cromatógrafo Alliance Bio e2796 acoplado a un detector de fluorescencia Waters 2475 con una columna TSKgel Amido-80. Los grupos hidroxilo de los glicanos inyectados interaccionan con los grupos polares de la columna y luego son eluidos por un gradiente acuoso y detectados por fluorescencia a una longitud de onda de 330 nm de excitación y 420 nm de emisión. Los azúcares más pequeños, con menos grupos hidroxilo eluyen a bajas concentraciones de solvente acuoso seguidos por los glicanos más grandes.

### 8.2.14 – Cultivos con 5-Aza-2`deoxitidina (5Aza2) y análisis de metilación.

Se siguió el protocolo de Yang y colaboradores (2010). Brevemente se realizó el cultivo de igual forma que en el punto 8.2.7, y se suplementó con 5Aza2 disuelto en PBS cada 24 h durante las primeras 72 h de cultivo a una concentración final de 4  $\mu$ M. Cada 24 h se tomó una pequeña alícuota para evaluar la concentración celular, viabilidad y metabolitos, así como para purificar el AcM y evaluar su patrón de N-glicosilación.

El 5Aza2 es un análogo de la citidina con un grupo Aza en lugar del carbono en la posición 5. La presencia de este grupo une covalentemente a la DNMT durante la replicación del ADN, la formación de este complejo induce la actividad de la ubiquitina E3 ligasa que da como resultado la degradación proteosómica de la enzima. (**Figura 9**).



**Figura 9. Mecanismo de acción del 5-aza-2`deoxitidina.** A) Estructura química del 5aza2. B) Durante la replicación del ADN el 5aza2 puede incorporarse a la molécula naciente de forma aleatoria. De hacerlo en una región CpG las DNMT de mantenimiento (DNMT1) y de novo (DNMT3) se unirán de forma irreversible al inhibidor al intentar metilarlo lo que disminuirá su concentración durante cada división celular provocando una hipometilación aleatoria.

#### 8.2.14.1 – Determinación del porcentaje de metilación total del ADN.

Se determinó el porcentaje de metilación total del genoma mediante el kit MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Epigentek, P-1030-48) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, el ADN purificado se colocó en pocillos tratados específicamente para una alta afinidad por el ADN. El porcentaje de citosinas metiladas (5mC) en la fracción de ADN se detectó usando anticuerpos de captura y detección para cuantificarse colorimétricamente leyendo la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. El porcentaje de citosinas metiladas es proporcional a la intensidad media.

Para calcular este porcentaje de metilación, primero fue necesario generar una curva estándar graficando la densidad óptica contra el control positivo en cada punto para obtener la ecuación de la recta correspondiente. (véase Anexos). Luego, se calculó el porcentaje de ADN metilado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de } 5mC = e^{\left(\frac{Y-b}{a}\right)/S} * 100\% \quad (11)$$

donde S es la cantidad de ADN en ng, Y es el valor de absorbancia obtenido, b es la ordenada al origen y a es la pendiente de la recta obtenida.

#### 8.2.14 – Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las variables cuantitativas se utilizó la media  $\pm$  desviación estándar. El análisis de los datos fue realizado con un análisis de varianza -prueba de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 7,  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

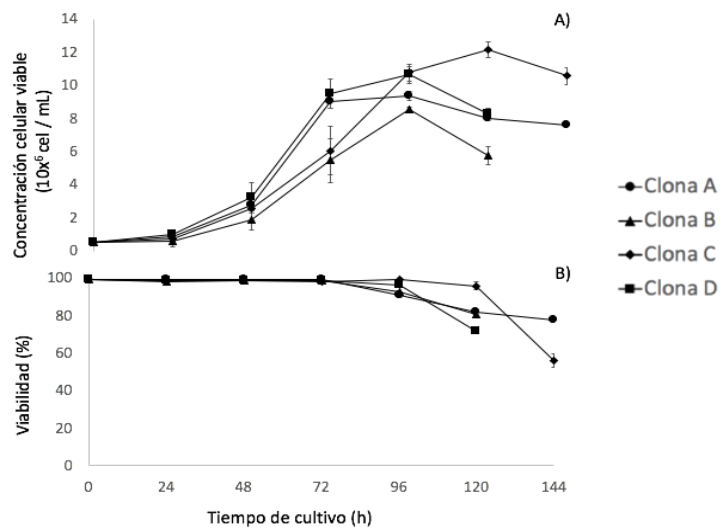


# IX. Resultados y discusión

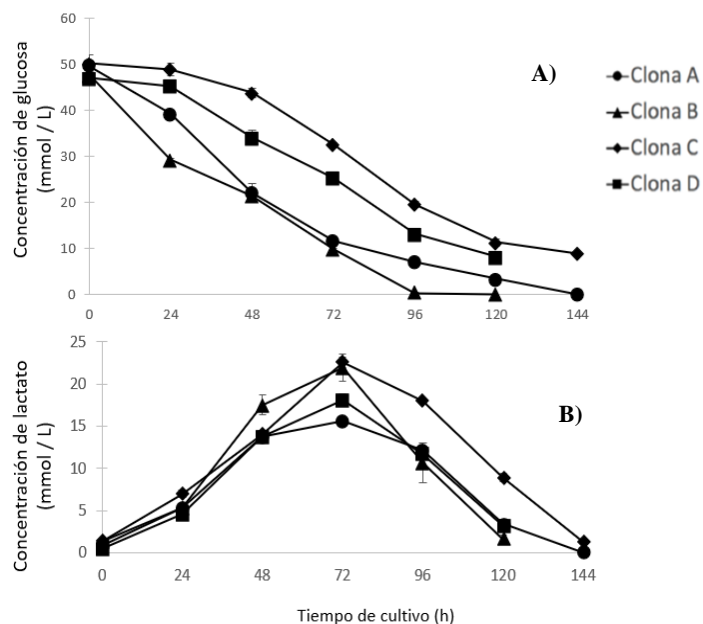
## 9.1 – Caracterización inicial de las sub clonas

Las células CHO son uno de los sistemas más utilizados en la producción de proteínas recombinantes como son los anticuerpos monoclonales (Walsh, 2018). Durante el proceso de transformación y selección de células productoras, se producen poblaciones celulares con una gran diversidad de fenotipos y genotipos entre las líneas parentales y las clonas generadas. Para generar una línea celular monoclonal con buena producción y estable es necesario una selección exhaustiva de cientos de células, por lo que evitar la heterogeneidad celular implica un reto importante en la industria (Pilbrough & Gray, 2009) que además de elevar los costos de producción por el tiempo y la mano de obra requerida (Davies *et al*, 2012). Se han propuesto diferentes causas que originan la heterogeneidad celular incluyendo aspectos bioquímicos (Le *et al.*, 2012) y genéticos (Wurn & Wurnn, 2017), aquellas relacionadas a las presiones de selección y/o factores ambientales (Brownw & Al-Rubeai, 2007). Sin embargo, la base molecular de la diversidad poblacional aún no se comprende del todo y los procesos celulares subyacentes deben caracterizarse (Wipperman & Noll, 2017). Uno de estos procesos es la epigenética, puntualmente la metilación del ADN en los residuos de citosina, que contribuye significativamente al fenotipo cinético y bioquímico de la célula (Weinguny et al., 2020).

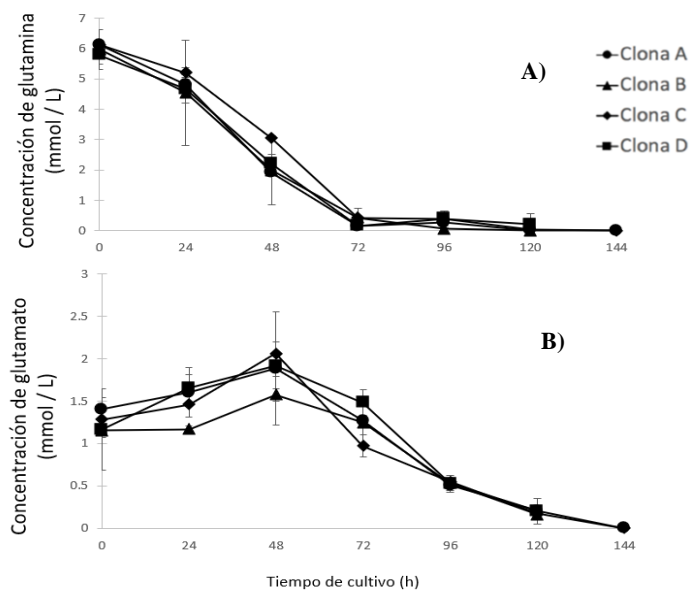
En el presente estudio se realizó la caracterización cinética y fisiológica de cuatro sub clonas generadas durante el mismo proceso de selección, por lo que teóricamente deberían ser similares y altamente productoras de un AcM modelo asumiendo que poseen el mismo sitio de integración del transgén al ser subclonas de la misma clona parental transfectada. Se prestó especial atención al grado de metilación del ADN y cómo este puede ser un posible factor de la heterogeneidad observada entre las sub clonas estudiadas.



**Figura 10. Cinética de crecimiento de cultivo en lote de las clonas estudiadas.** Concentración celular viable (A) y porcentaje de viabilidad (B). Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 130 rpm.



**Figura 11. Consumo y/o producción de metabolitos en cultivo en lote de las clonas estudiadas.** Concentración de glucosa (A) y concentración de lactato (B). Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 130 rpm.



**Figura 12. Consumo y/o producción de metabolitos en cultivo en lote de las clonas estudiadas.** Concentración de glutamina (A) y concentración de glutamato (B). Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 130 rpm.

Todos los parámetros cinéticos y estequiométricos calculados para las cuatro sub clonas se muestran en la **Tabla 3**. Las subclonas B y C tuvieron un  $\mu$  estadísticamente similar entre ellas, y a su vez estadísticamente diferente a la  $\mu$  de subclonas A y D; las cuatro con valores que van acorde a lo publicado por López-Meza (2015) para clonas recombinantes de células CHO; también, presentaron un comportamiento diferente entre la concentración celular y viabilidad (**Figura 10**). Las cuatro sub clonas alcanzaron su fase exponencial en el periodo de 24 a 72 h con su punto máximo de concentración celular viable a las 96 h, con excepción de la sub clona C cuyo pico se observó a las 120 h. La mayor concentración celular se obtuvo con la sub clona C que alcanzó  $12.1 \times 10^6 \pm 1.18 \times 10^6$  cel / mL estadísticamente diferente a la sub clona B con  $8.5 \times 10^6 \pm 0.64 \times 10^6$  cel / mL siendo la menor.

En cuanto a los rendimientos de producción de biomasa con respecto al consumo de fuentes de carbono y nitrógeno como son la glucosa y la glutamina, las cuatro sub clonas presentaron diferencias estadísticamente significativas. En el rendimiento de biomasa con respecto al consumo de glucosa ( $Y_{X/Glc}$ ) la sub clona D, estadísticamente significativo fue la más eficiente con un rendimiento de  $0.41 \pm$

$4.08 \times 10^{-2} \text{ cel} \cdot \text{pmol}^{-1}$  a pesar de que la sub Clona C fue la que presentó la mayor concentración celular. La sub Clona B por otro lado, fue la que menor rendimiento tuvo con respecto a la glucosa con un valor de  $0.13 \pm 3.78 \times 10^{-2} \text{ cel} \cdot \text{pmol}^{-1}$ , lo cual se refleja en su baja producción de biomasa, aunque estadísticamente similar a la subclona A.

Por otra parte, en el rendimiento de biomasa con respecto al consumo de glutamina ( $Y_{X/Gln}$ ) las sub clonas A y D tuvieron un valor estadísticamente similar entre sí, al igual que las sub clonas B y C con un rendimiento de  $0.89 \pm 1.94 \text{ cel} \cdot \text{pmol}^{-1}$  y  $0.92 \pm 1.76 \text{ cel} \cdot \text{pmol}^{-1}$ , respectivamente. Esto nos indica que la sub clona B es más eficiente en el consumo de glutamina que de glucosa para el crecimiento celular. Interesantemente, cuando se comparó la tasa específica de consumo de la glucosa ( $q_{glc}$ ) la sub clona B fue la que más rápidamente consumió esta fuente de carbono, estadísticamente significativo en comparación a las otras subclonas con un valor de  $0.28 \pm 5.5 \text{ pmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , no obstante, esta es la clona con el menor crecimiento y que alcanzó la menor concentración celular máxima. Esto significa que la energía adquirida de la glucosa se redirecciona hacia la síntesis de algún otro metabolito que no estamos considerando, hacia la producción del AcM o al propio mantenimiento celular que repercute en su baja producción de biomasa (Pereira *et al.*, 2018; Fernández-Martell *et al.*, 2017).

Un comportamiento muy similar se observó en la tasa específica de consumo de la glutamina ( $q_{gln}$ ) donde las sub Clonas A y D tuvieron velocidades similares entre sí, pero menos las sub Clonas B y C que mostraron velocidades similares entre ellas, aunque sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3. Principales parámetros cinéticos y estequiométricos de las clonas A, B, C y D en cultivo en lote. Los valores corresponden al promedio y se presentan junto a la desviación estándar de cultivos por triplicado. Se consideró estadísticamente significativo  $p < 0.05$ . Subíndice diferente indica que si existe una diferencia estadística significativa.

Parámetros	Clona A	Clona B	Clona C	Clona D
$X_{max}$ ( $10^6$ cel / ml)	$9.35 \pm 0.17$ <sub>A</sub>	$8.5 \pm 0.15$ <sub>B</sub>	$12.1 \pm 0.50$ <sub>C</sub>	$10.61 \pm 0.50$ <sub>D</sub>
$Glc_{inc}$ (mmol / L)	$49.63 \pm 0.51$ <sub>A</sub>	$47.8 \pm 1.55$ <sub>A</sub>	$50.23 \pm 1.88$ <sub>A</sub>	$47.1 \pm 0.67$ <sub>A</sub>
$LaC_{max}$ (mmol / L)	$15.6 \pm 0.36$ <sub>A</sub>	$21.9 \pm 1.64$ <sub>B</sub>	$22.5 \pm 0.23$ <sub>B</sub>	$18.13 \pm 0.68$ <sub>C</sub>
$Gln_{inc}$ (mmol / L)	$6.11 \pm 0.12$ <sub>A</sub>	$5.97 \pm 0.66$ <sub>A</sub>	$6.12 \pm 0.01$ <sub>A</sub>	$5.79 \pm 0.31$ <sub>A</sub>
$Glu_{max}$ (mmol / L)	$1.15 \pm 0.02$ <sub>A</sub>	$1.41 \pm 0.08$ <sub>A</sub>	$1.28 \pm 0.14$ <sub>A</sub>	$1.17 \pm 0.48$ <sub>A</sub>
$AcM_{max}$ (mg/ml)	$3.09 \pm 0.24$ <sub>A</sub>	$0.78 \pm 0.15$ <sub>B</sub>	$3.55 \pm 0.29$ <sub>C</sub>	$3.38 \pm 0.10$ <sub>A</sub>
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$0.042 \pm 1.85 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.035 \pm 5.42 \times 10^{-3}$ <sub>B</sub>	$0.036 \pm 1.40 \times 10^{-3}$ <sub>B</sub>	$0.042 \pm 1.47 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>
$Y_{x/Glc}$ ( $cel \cdot pmol^{-1}$ )	$0.23 \pm 1.36 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.13 \pm 3.78 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.30 \pm 7.15 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.41 \pm 4.08 \times 10^{-2}$ <sub>C</sub>
$Y_{Lac/x}$ ( $pmol \cdot cel^{-1}$ )	$1.72 \pm 9.27 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$4.31 \pm 9.05 \times 10^{-1}$ <sub>B</sub>	$4.13 \pm 6.2 \times 10^{-1}$ <sub>B</sub>	$1.97 \pm 1.44 \times 10^{-1}$ <sub>A</sub>
$Y_{x/Gln}$ ( $cel \cdot pmol^{-1}$ )	$1.44 \pm 6.82 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.89 \pm 1.94 \times 10^{-1}$ <sub>B</sub>	$0.92 \pm 1.76 \times 10^{-1}$ <sub>B</sub>	$1.61 \pm 2.32 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>
$Y_{Glu/x}$ ( $pmol \cdot cel^{-1}$ )	$0.02 \pm 1.53 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.19 \pm 64.45 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.08 \pm 5.39 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.07 \pm 2.47 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>
$Y_{Glu/Gln}$ ( $mmol \cdot mmol^{-1}$ )	$0.02 \pm 2.36 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.16 \pm 5.75 \times 10^{-3}$ <sub>B</sub>	$0.07 \pm 4.07 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.11 \pm 2.80 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>
$Y_{Lac/Glc}$ ( $mmol \cdot mmol^{-1}$ )	$0.39 \pm 8.31 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.54 \pm 6.99 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$1.22 \pm 1.34 \times 10^{-1}$ <sub>B</sub>	$0.81 \pm 3.66 \times 10^{-2}$ <sub>C</sub>
$q_{Glc}$ ( $pmol \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$0.19 \pm 4.30 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.28 \pm 5.51 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.12 \pm 2.26 \times 10^{-2}$ <sub>C</sub>	$0.10 \pm 8.87 \times 10^{-3}$ <sub>C</sub>
$q_{Lac}$ ( $pmol \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$0.07 \pm 2.62 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.15 \pm 1.05 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.15 \pm 1.76 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.08 \pm 4.04 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>
$q_{Gln}$ ( $pmol \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$0.03 \pm 1.02 \times 10^{-4}$ <sub>A</sub>	$0.04 \pm 3.63 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.04 \pm 5.62 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.03 \pm 3.50 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>
$q_{Glu}$ ( $pmol \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$0.001 \pm 6.87 \times 10^{-4}$ <sub>A</sub>	$0.006 \pm 6.58 \times 10^{-4}$ <sub>B</sub>	$0.003 \pm 1.82 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.003 \pm 1.03 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>
$q_{AcM}$ ( $pg \cdot cel^{-1} \cdot día^{-1}$ )	$5.8 \pm 0.69$ <sub>A</sub>	$2.0 \pm 0.09$ <sub>B</sub>	$6.6 \pm 0.05$ <sub>C</sub>	$5.9 \pm 0.50$ <sub>A</sub>

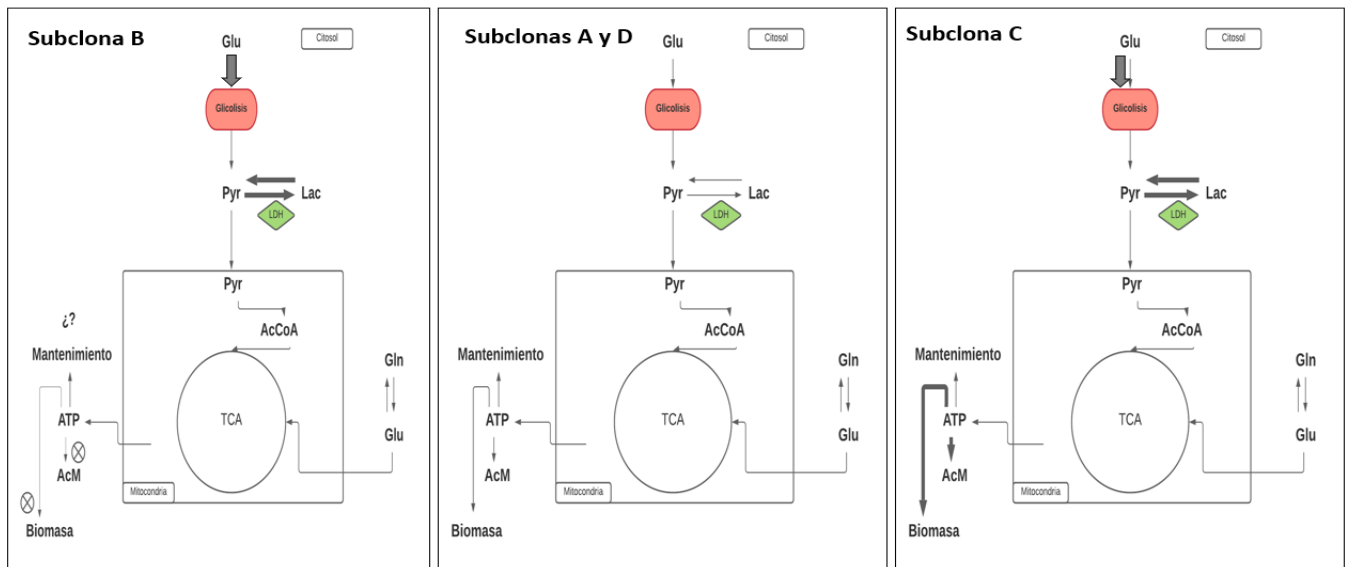
Las cuatro sub clonas estudiadas presentaron una alta concentración de lactato, siendo las sub clonas B y C las mayores productoras con un valor de  $21.9 \pm 1.64$  mmol / L y  $22.5 \pm 0.23$  mmol / L, respectivamente siendo estadísticamente significativo en comparación con las subclonas A y D. Se ha reportado que las células CHO en cultivo tienen una alta producción de lactato debido a un metabolismo descontrolado de la glucosa, característico de células inmortalizadas (Annibaldi & Widmann, 2010), cuyo resultado es una acidificación del medio y un cambio en la osmolaridad que puede comprometer el crecimiento celular (Gupta et al., 2017). Por esta razón se han utilizado distintos acercamientos para disminuir la producción de lactato como: 1) reemplazar la glucosa, glutamina o ambos por azúcares y/o aminoácidos alternativos (Altamirano et al., 1999; Altamirano et al., 2000), 2) control de la alimentación de glucosa y/o glutamina (Glacken et al., 1986; Behjousiar et al., 2012), 3) suplementación de cobre (Yuk et al., 2014), 4) reducción en la temperatura (Bollati-Fangolin et al., 2008), 5) reducción del pH (Yoon et al., 2004) y 6) selección de clonas con un alto consumo de lactato (Li et al., 2011). Interesantemente, la sub clona B tuvo una menor concentración celular, lo que indica que esta elevada producción de lactato no está relacionada con el número de células, como podría ser para la sub clona C, cuya concentración celular fue la mayor de las cuatro sub clonas estudiadas; indicando una diferencia significativa en el metabolismo celular entre la sub clona C y B.

A las 72 h de cultivo todas las sub clonas presentaron un “switch” metabólico (**Fig. 11**) donde pasaron de la producción de lactato, a su consumo como fuente de carbono; a pesar de que tal cambio metabólico es deseable, porque parece favorecer el rendimiento óptimo del proceso, dicho efecto no es general ni se puede controlar fácilmente (Zagari et al., 2013).

Las células CHO tienen la capacidad de consumir el lactato como fuente de carbono (Hartley et al., 2018) y se ha observado, que la tasa de formación de lactato y el cambio a su consumo, varía entre clonas bajo las mismas condiciones (Le et al., 2012). Se ha llegado a un consenso donde este “switch” metabólico está influenciado por la concentración de glucosa disponible en el medio (Altamirano et al., 2004), su consumo total (Altamirano et al., 2006) o en la ausencia de glutamina (Ghorbaniaghdam et al., 2014).

En la **Fig. 12** se observa claramente como a las 72 h de cultivo, se agota la glutamina en el medio para las cuatro sub clonas, momento en el cual arranca “switch” metabólico de lactato, indicando, al menos para estas condiciones particulares aquí estudiadas, que es la concentración de glutamina y no de glucosa, el factor determinante para este cambio. Este metabolismo energético (**Fig. 14**) es característico del efecto Warbug donde el alto consumo de glucosa en células inmortalizadas lleva la glicólisis hacia un exceso de piruvato, que no ingresa al ciclo de Krebs para la producción de energía mediante la fosforilación oxidativa, sino que es reducido a lactato para garantizar la regeneración de NAD<sup>+</sup> y mantener la glicólisis activa (Torres *et al.*, 2018). Lo que explica la elevada producción de lactato durante las primeras horas de cultivo. De forma paralela, este “pool” de piruvato también puede mantenerse gracias a la glutamina, que mediante reacciones anapleróticas reabastece el ciclo de Krebs, donde se metaboliza a malato y puede salir de la mitocondria gracias a las lanzaderas malato-aspartato, para oxidarse a piruvato por las enzimas málicas (Hartley *et al.*, 2018; Locasale & Cantley, 2011). En este punto, la concentración de lactato es mucho mayor a la de piruvato, y es esta diferencia en las concentraciones, lo que favorece la reacción hacia la formación de piruvato. Este mecanismo explica por qué el “switch” metabólico inicia a las 72 h de cultivo, que es cuando se acaba la glutamina.

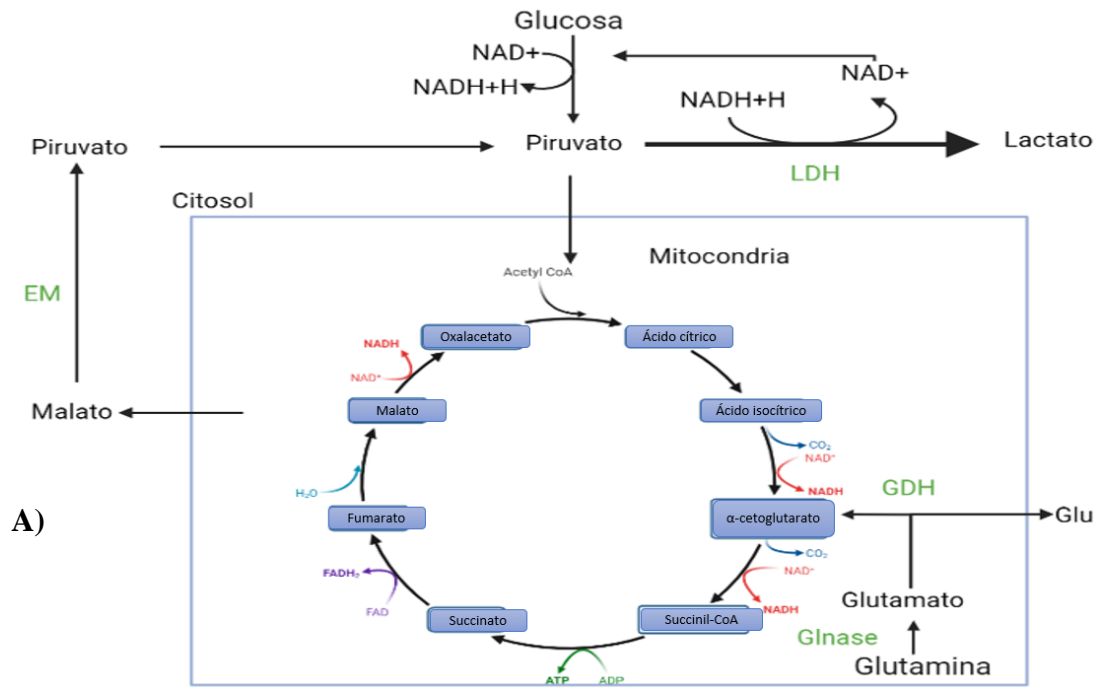
A pesar de que las cuatro sub clonas siguen este metabolismo base, presentan parámetros cinéticos y estequiométricos distintos entre ellas, dentro las cuales las sub clona A y D son muy parecidas estadísticamente, mientras que las sub clonas B y C son diferentes en términos de su producción de biomasa, rendimientos y en las tasas de consumo y formación de los metabolitos evaluados, lo que hace a estas sub clonas candidatas interesantes (**Fig. 13**).



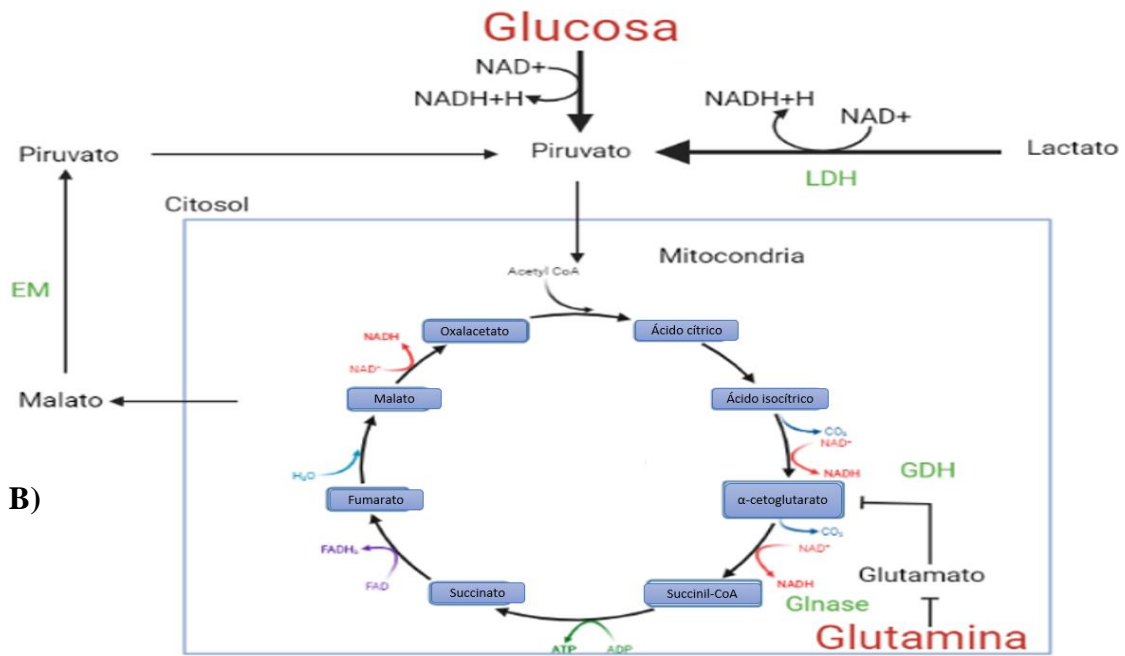
**Figura 13. Posibles perfiles metabólicos entre las cuatro subclonas.** Tanto la subclona B como C tienen un alto consumo de glucosa y producción de lactato, probablemente debido a una mayor concentración de transportadores de glucosa o de enzimas críticas en las vías metabólicas, sin embargo, la subclona B no aprovecha estas fuentes de carbono ni para el crecimiento celular, ni para la producción de AcM a diferencia de la subclona C que tiene una alta producción de biomasa de AcM. Por otro lado, las subclonas A y D tienen perfiles metabólicos similares entre sí.

La producción del AcM modelo de las cuatro subclonas estudiadas se muestra en la **Fig. 15**. Estadísticamente la subclona C fue la mejor productora con una productividad específica ( $q_P$ ) de  $6.6 \pm 0.05 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  y la subclona B la menor con  $2.0 \pm 0.09 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ . Interesantemente, la subclona B presenta un elevado consumo de glucosa y de glutamina, pero un bajo rendimiento de ambos metabolitos para la producción de biomasa. Esto indica que la subclona B, a pesar de aprovechar estas fuentes de carbono y de nitrógeno, no las utiliza ni para el crecimiento celular ni para la producción del AcM modelo de interés. Probablemente esta energía se está redireccionando hacia algún otro metabolito no evaluado, pero también es una señal clara de que existe un factor de variabilidad que, si se logra determinar, se podría aprovechar para convertir a la subclona B en una buena productora como lo es la subclona C.



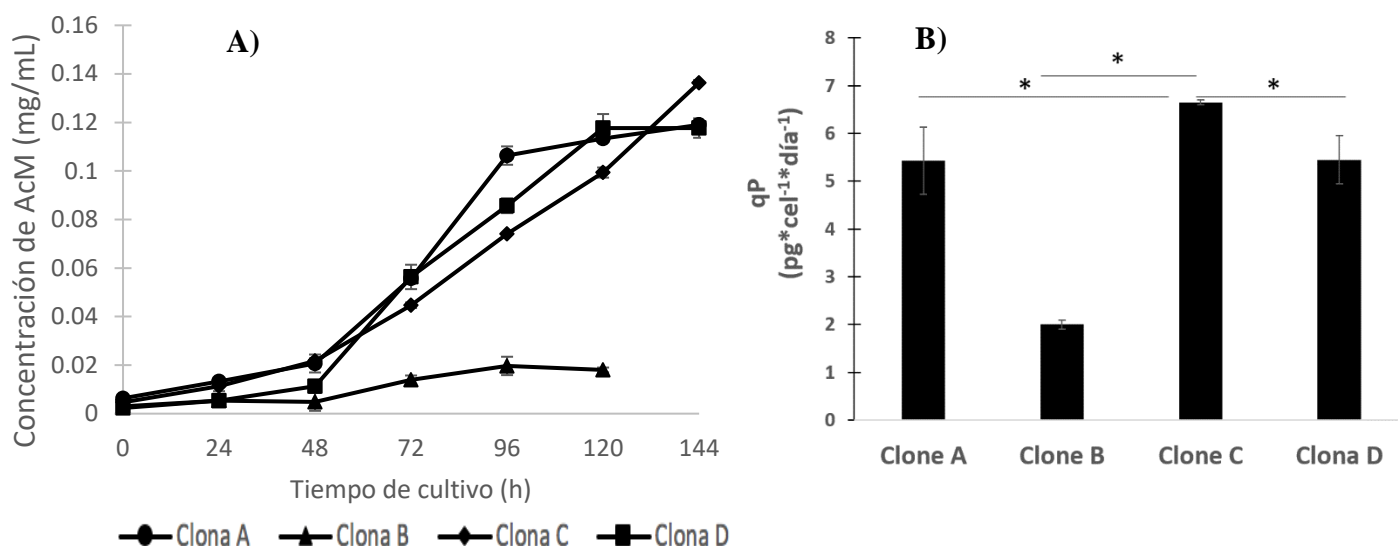


A)



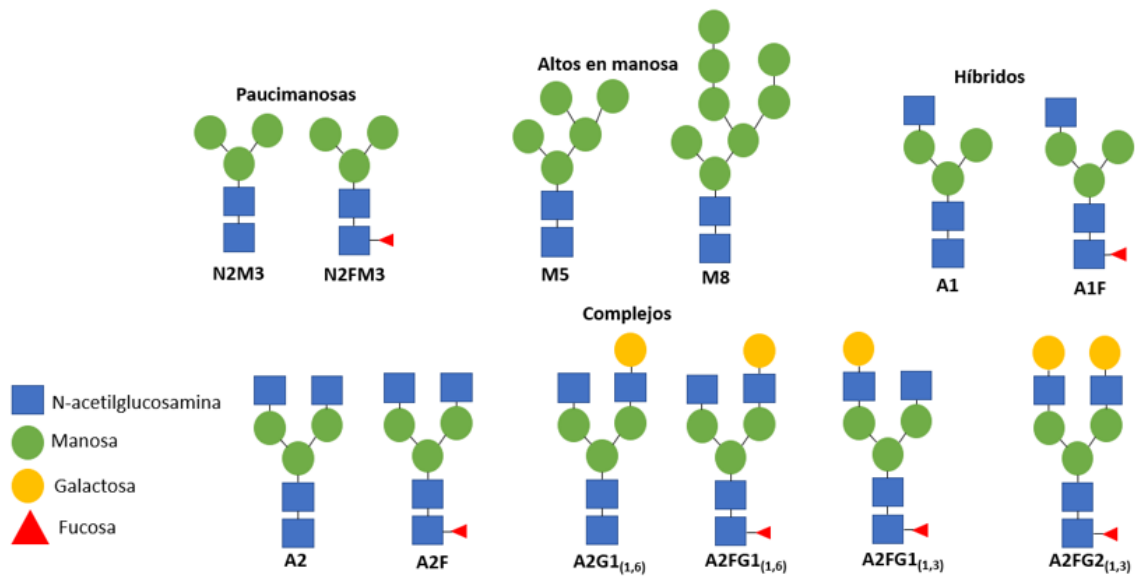
B)

**Figura 14. Causas del switch metabólico de lactato.** A) En presencia de glutamina, esta puede abastecer el ciclo de Krebs mediante reacciones anapleróticas hacia la producción de malato, el cual puede ser transportado al citosol, donde las enzimas málicas lo oxidaran a piruvato, el cual puede reducirse a lactato para mantener los niveles de  $\text{NAD}^+$ . B) Cuando la glutamina se agota, se detiene ese suplemento de piruvato lo que en adición a la alta concentración de lactato ya en el medio, redirecciona la reacción hacia piruvato tomando el lactato como fuente de carbono.



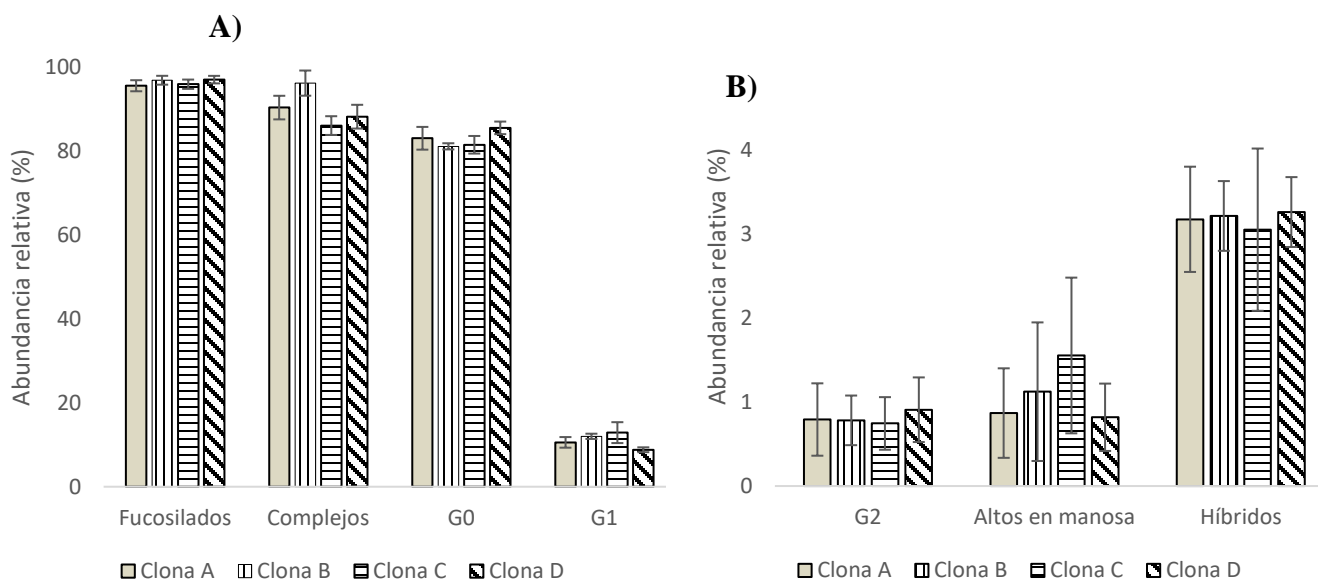
**Figura 15. Producción de AcM de las sub clonas estudiadas en cultivo en lote.** A) Concentración de AcM producido por las cuatro sub clonas estudiadas. B) Velocidades específicas de producción del AcM de las cuatro subclonas estudiadas. La línea con el asterisco indica significancia estadística entre ambos valores  $p < 0.05$ . Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 130 rpm. Hubo significancia estadística en la qp de la subclona C en comparación a las demás subclonas con un valor  $p < 0.5$

Para finalizar la caracterización inicial de las cuatro sub clonas estudiadas se determinó el perfil de N-glicosilación del AcM modelo producido (**Fig. 16**). Las cuatro subclases de IgG contienen un solo sitio de N-glicosilación en la región constante de la cadena pesada, que está ocupado generalmente por oligosacáridos biantenarios, en gran parte fucosilados y parcialmente truncos que pueden llevar una N-acetilglucosamina (Wuhrer et al., 2007). Las estructuras mayoritarias obtenidas para las cuatro sub clonas van desde estructuras simples como paucimanasas, hasta estructuras más complejas presentes en los IgG1 humanos, como son glicanos biantenarios fucosilados con y sin galactosa terminal (**Fig. 16**).



**Figura 16. Representación gráfica de las estructuras propuestas para los oligosacáridos principales presentes en el AcM modelo producido por las cuatro subclonas estudiadas.** Estructuras determinadas mediante cromatografía de interacción hidrofílica.

Estas estructuras propuestas y su abundancia relativa (**Fig. 17**) van acorde a lo reportado por el grupo de Szabo y colaboradores en 2022, donde determinaron que el perfil de N-glicosilación del AcM producido presenta un alto porcentaje de fucosilación y estructuras complejas. Interesantemente reportan estructuras con oligosacáridos M4 con y sin fucosa y FA1GN (3) Man(6) que no encontramos nosotros. Estas diferencias, con respecto a nuestros resultados, probablemente, sean debidas a que en su caso emplearon como método de análisis la electroforesis capilar, método diferente al empleado por nosotros.



**Figura 17. Perfil de N-glicosilación de las sub clonas estudiadas.** A) Abundancia relativa de estructuras fucosiladas, complejas con y sin galactosa terminal. B) Estructuras con dos galactosas terminales, altas en manosa e híbridas. Los valores promedio se muestran con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 130 rpm. No se encontraron diferencias significativas.

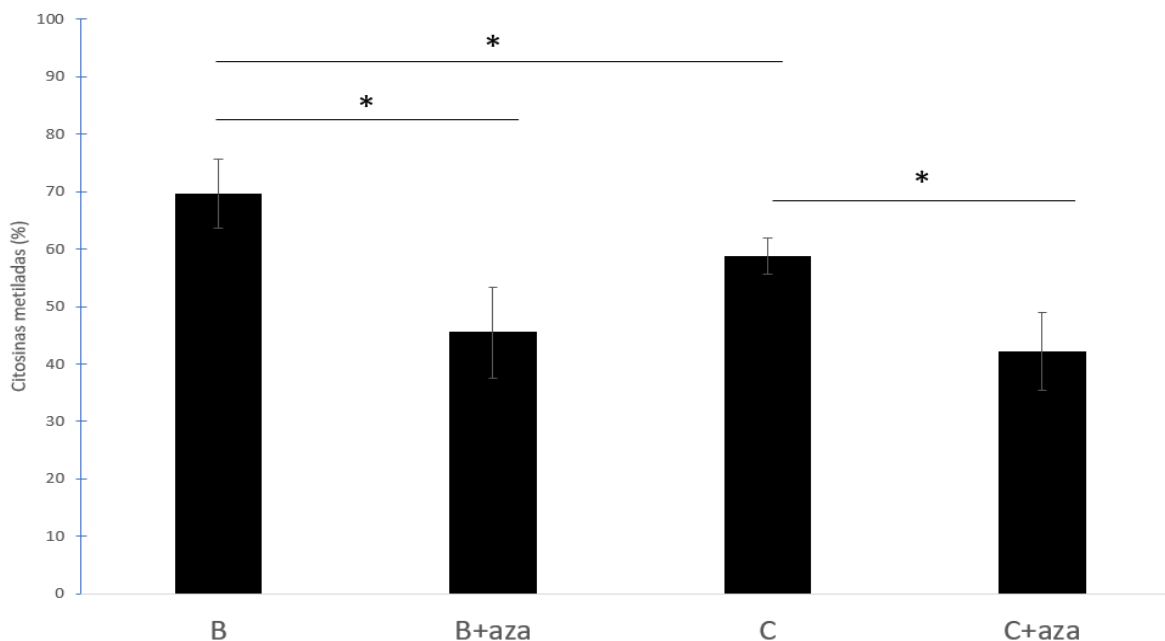
Como puede apreciarse en la Fig. 17, el perfil de N-glicosilación del AcM producido por las cuatro clonas fue muy similar. La glicosilación de los IgG es una reacción química dirigida por enzimas que ocurre en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, por tanto, está sujeta a la concentración de las glicosiltransferasas y glucosidasas correspondientes, sus respectivos cofactores, así como de la presencia de nucleótidos azúcar (Boune et al., 2020; Sumit et al., 2019); más otras variables como el pH (Rivinoja et al., 2009), la osmolaridad (Alhuthali et al., 2021) y circunstancias fisiológicas y patológicas específicas (Wuhrer et al., 2007). El diseño experimental del trabajo mantuvo las mismas condiciones de cultivo, sin alterar ninguna de estas variables, por lo que se puede concluir que las similitudes experimentales fueron más importantes que las variaciones entre clonas y por esta razón no se encontró cambio significativo en el patrón de N-glicosilación entre las cuatro sub clonas estudiadas.

Con esta caracterización inicial es que se decidió continuar el trabajo únicamente con las sub Clonas B y C, al ser la menor y la mayor productora del AcM modelo, respectivamente. Aunado al hecho de que existe un factor que limita

esta producción en la sub Clona B, al presentar parámetros cinéticos y estequiométricos importantes como un alto consumo de fuentes de carbono y nitrógeno, como señal de que cuenta con el metabolismo necesario para ser una buena productora.

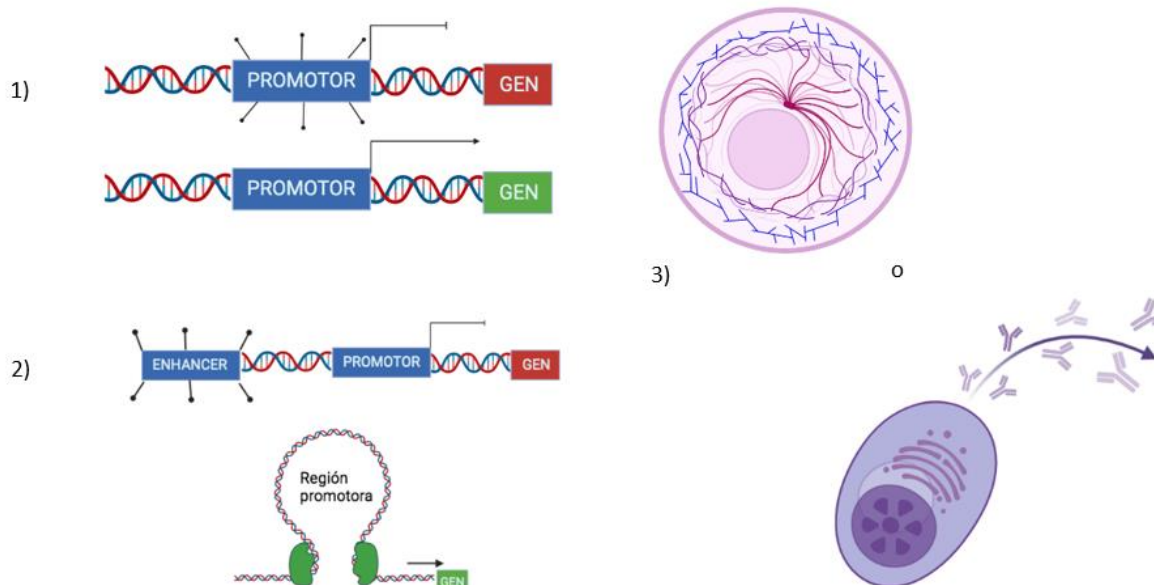
## 9.2 – Cambio en el porcentaje de metilación del ADN ante una hipometilación aleatoria.

Un factor potencialmente responsable del fenotipo observado de la subclona B puede ser el grado de metilación del ADN, que a su vez repercute en un mayor silenciamiento de genes críticos para la producción de la proteína heteróloga, como los reportados por el grupo de Chen y colaboradores (2019). Mediante un ensayo tipo ELISA se cuantificó colorimétricamente el porcentaje de 5mC del ADN total de la sub clona B y C (**Fig. 18**) obteniendo un valor de  $69.65 \pm 5.98\%$  y  $58 \pm 3.12\%$  respectivamente. Se ha reportado que para células CHO el porcentaje de metilación global varía, dependiendo de la clona en cuestión y puede ser de un 60% hasta un poco más de 80% de 5mC (Wipperman et al., 2015) por lo que los valores encontrados van acorde a la literatura.



**Figura 18. Porcentaje de citosinas metiladas del ADN antes y después del inhibidor Aza.** Las subclonas B y C presentan una diferencia significativa en su porcentaje de citosinas metiladas el cual disminuyó después del tratamiento. La línea con el asterisco indica significancia estadística entre ambos valores  $p < 0.05$ .

La diferencia significativa en el grado de metilación del ADN entre la sub clona B y C, sugiere que existe un mayor silenciamiento del ADN en la sub clona B; probablemente a nivel del transgén, alguna región potenciadora rio arriba del promotor o que exista una menor expresión de proteínas involucradas, tanto en el procesamiento del ARN mensajero como del transporte del AcM modelo (**Fig. 19**) (Chen et al., 2019; Kaneyoshi et al., 2018; Orellana et al., 2015; Attwood et al., 2002).



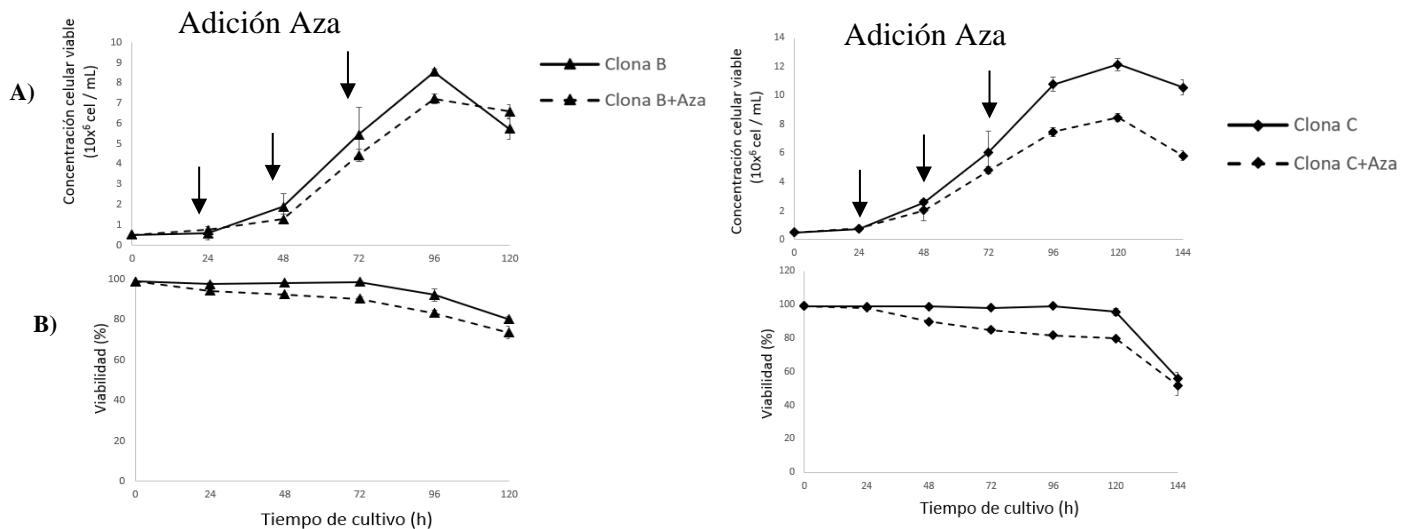
**Figura 19. Efecto de la metilación sobre la producción de AcM.** La metilación puede darse al nivel de promotor del transgén lo que determinará su expresión (1), en una región potenciadora rio arriba de la región promotora (2) o bien, incrementando de proteínas transportadoras y/o involucradas en el procesamiento del transgén; todo esto repercutiendo en una mayor secreción del AcM al medio (3).

Como era esperado, el inhibidor 5Aza2 disminuyó el porcentaje de 5mC en ambas sub Clonas, al disminuir la concentración libre de la DNMT en la célula, provocando una hipometilación aleatoria. Interesantemente, los niveles de metilación después del tratamiento disminuyen a valores estadísticamente similares siendo  $45.46 \pm 7.8\%$  y  $42.13 \pm 6.75\%$  para las sub clona B y C, respectivamente. Lo que sugiere que probablemente participen otros mecanismos de metilación con enzimas menos abundantes a la DNTM que mantienen algún tipo de metilación

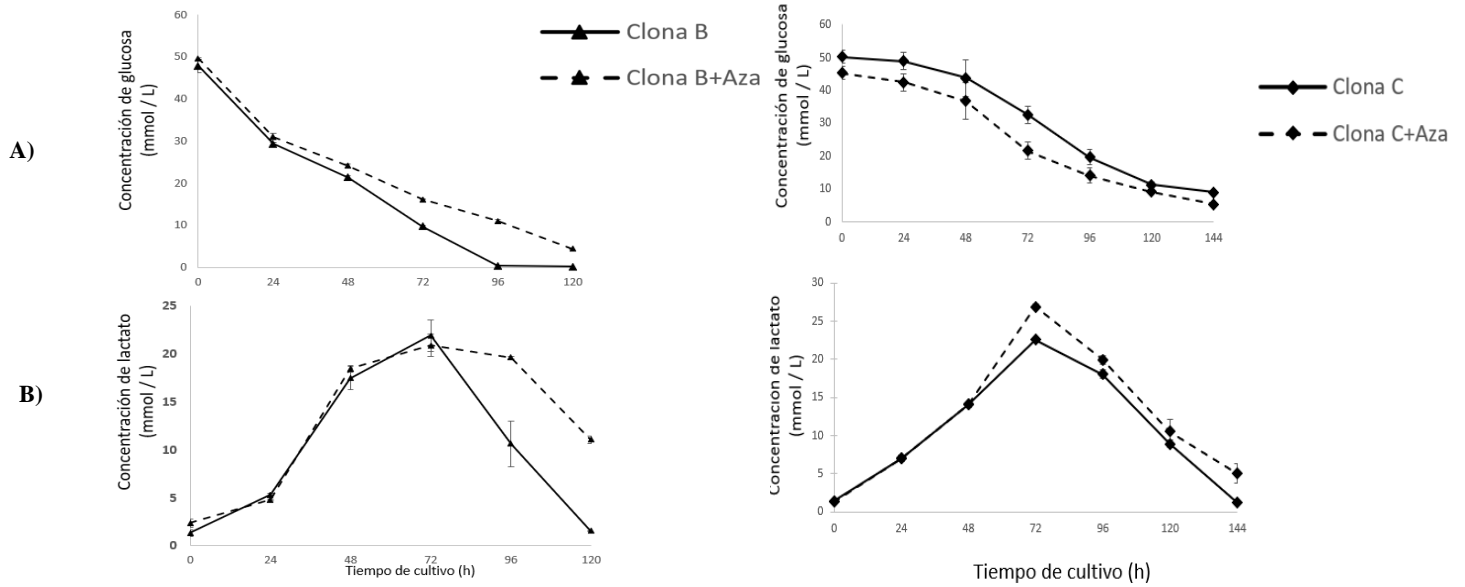
basal característico de células inmortalizadas (Weinguny et al., 2020; Partha & Rakesh, 2004).

### 9.3 – Efectos de la hipometilación sobre la cinética y metabolismo celular

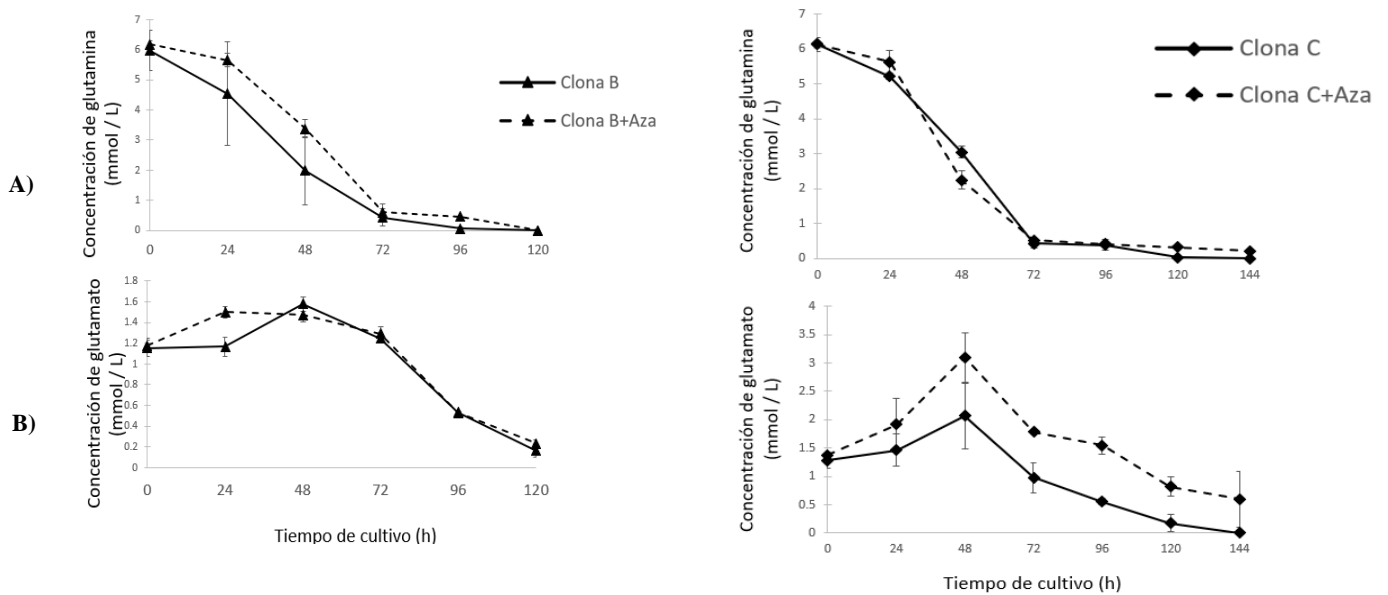
Una vez asegurada la hipometilación aleatoria en el ADN se prosiguió a evaluar su impacto en la cinética y metabolismo celular para las sub clona B y C. Se ha reportado que el inhibidor 5Aza2 es citotóxico para la célula (Yang et al., 2010) e incluso se ha utilizado como medicamento contra el cáncer (Momparler, 2005). Esto se debe a la inestabilidad cromosómica que resulta de la hipometilación del genoma (Davidson et al., 1992) dónde, además, la expresión de genes antes silenciados impone una nueva carga metabólica (Schmelz, et al., 2004). Por lo tanto, se probaron distintas concentración de 5Aza2 para determinar la dosis mínima y necesaria, que no comprometiera el crecimiento ni viabilidad celular siendo esta de 4 $\mu$ M (ver Anexos). Sin embargo, tanto para la sub clona B como C hubo una disminución en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.03\pm 5.22 \times 10^4 \text{ h}^{-1}$  y  $0.32\pm 2.43 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente, aunque no fue estadísticamente significativo, así como en la concentración celular máxima para ambas subclonas (**Fig. 20**).



**Figura 20. Cinética de crecimiento de cultivo en lote de la sub clona B y C con y sin Aza.** Concentración celular viable (A) y porcentaje de viabilidad (B). Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 130 rpm.



**Figura 21. Consumo y/o producción de metabolitos en cultivo en lote de la sub clona B y C con y sin Aza. Concentración de glucosa (A) y concentración de lactato (B). Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 130 rpm.**



**Figura 22. Consumo y/o producción de metabolitos en cultivo en lote de la sub clona B y C con y sin Aza. Concentración de glutamina (A) y concentración de glutamato (B). Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 130 rpm.**



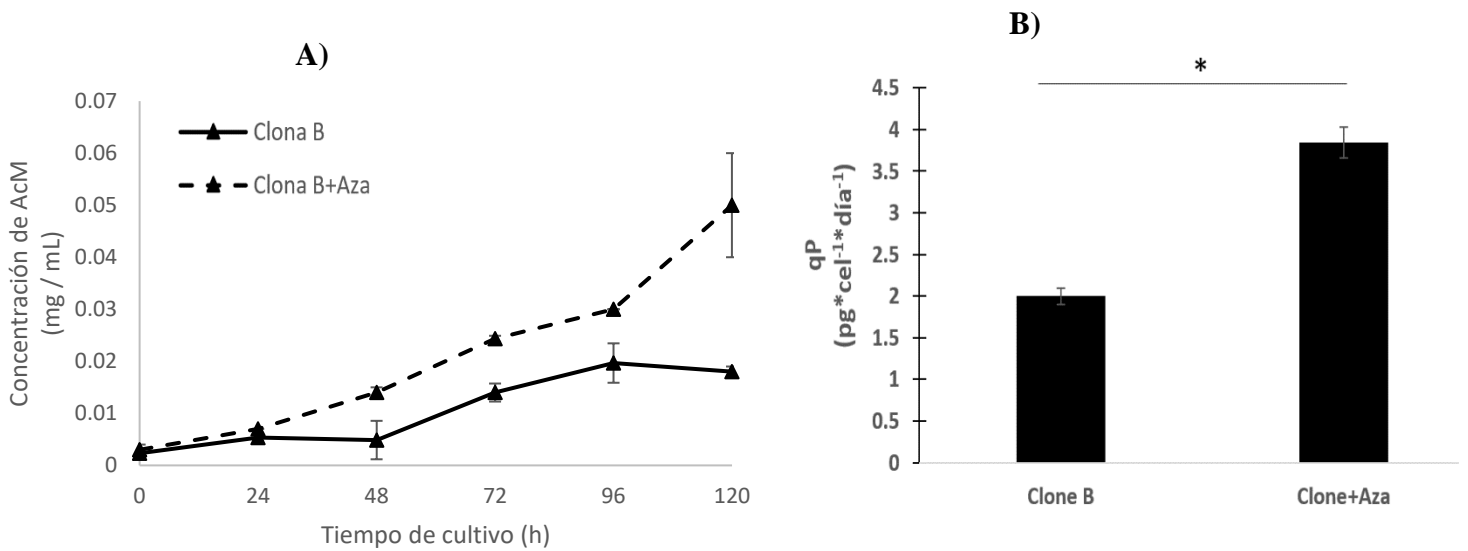
En términos de su metabolismo, ambas sub clonas mantuvieron el “switch” metabólico de lactato a las 72 h, acoplado con el agotamiento de la glutamina en el medio (**Fig. 21 y 22**). Interesantemente la sub clona B no consumió el lactato en totalidad. Se ha reportado que existen isoformas de la enzima LDH, siendo LDH-M codificada por el gen *Ldh-a* y LDH-H codificado por el gen *Ldh-b*. Ambas con distinta afinidad por el piruvato o lactato lo que una mayor expresión de una u otra, cambiará el flujo de la reacción. La enzima LDH-M tiene una mayor afinidad por el piruvato, por lo que cataliza preferentemente la reacción directa, mientras que la enzima LDH-H tiene una mayor afinidad por el lactato, por lo que tiende a catalizar la reacción inversa (Hartley et al., 2018). Es posible que la hipometilación provocada por el inhibidor, haya aumentado la expresión de la enzima LDH-M alterando el balance entre ambas isoformas disminuyendo la conversión de lactato a piruvato.

Tanto para la sub clona B como C tratadas con 5Aza2, los rendimientos  $Y_{x/Glc}$  y  $Y_{x/Gln}$  disminuyeron de forma estadísticamente significativa, indicando una menor eficiencia en el uso de estas fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento celular al inhibirse la metilación. Esto abre la posibilidad de usar esta energía para algún otro metabolito o producto de interés como el AcM modelo. Interesantemente, la  $q_{glc}$  en la sub clona C aumentó a pesar de tener un menor crecimiento celular, lo que muestra un cambio a favor del metabolismo de glucosa, quizás con una mayor concentración de transportadoras o una mayor expresión de enzimas críticas en la glicolisis (Selvi et al., 2010). En términos de la  $q_{gln}$  no hubo cambio significativo en ninguna de las sub clonas al ser expuestas a 5Aza2.

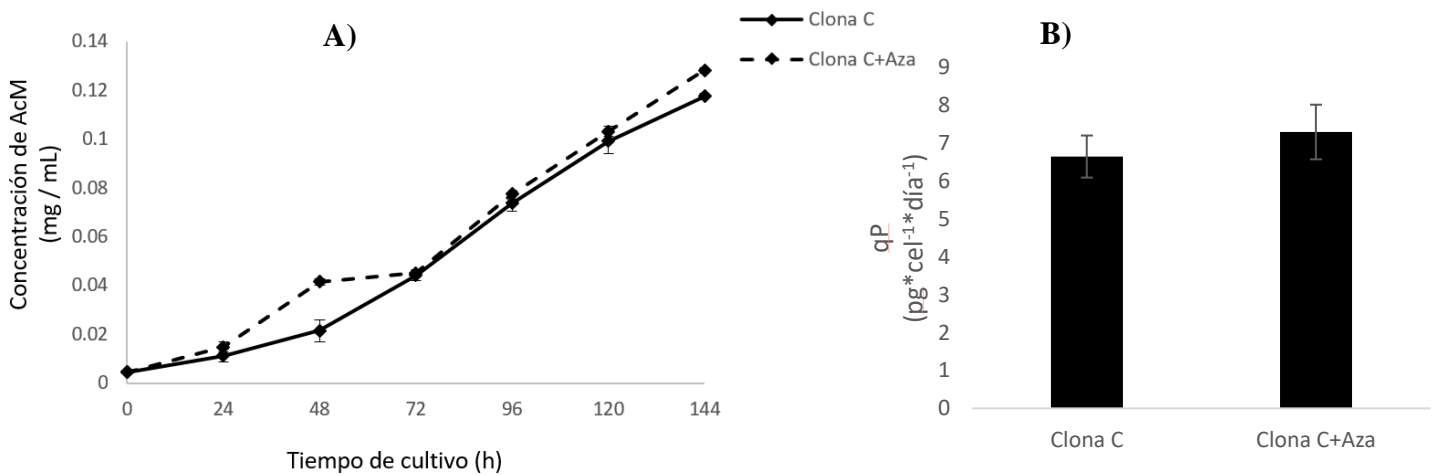
Todos los parámetros cinéticos y estequiométricos calculados para las sub Clonas B y C en presencia del inhibidor se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Principales parámetros cinéticos y estequiométricos de las clonas B y C, con y sin Aza en cultivo en lote. Los valores se muestran con a la desviación estándar de cultivos por triplicado. Se consideró estadísticamente significativo  $p < 0.05$ . Subíndice diferente indica que si existe una diferencia estadística significativa.

Parámetros	Clona B	Clona B+Aza	Clona C	Clona C+Aza
$X_{max}$ ( $10^6$ cel / mL)	$8.5 \pm 0.15$ <sub>A</sub>	$7.2 \pm 0.23$ <sub>A</sub>	$12.1 \pm 0.50$ <sub>B</sub>	$8.5 \pm 0.28$ <sub>A</sub>
$Glc_{inc}$ (mmol / L)	$47.8 \pm 1.55$ <sub>A</sub>	$49.57 \pm 0.2$ <sub>A</sub>	$50.23 \pm 1.88$ <sub>A</sub>	$45.33 \pm 2.0$ <sub>A</sub>
$LaC_{max}$ (mmol / L)	$21.9 \pm 1.64$ <sub>A</sub>	$20.9 \pm 1.15$ <sub>A</sub>	$22.5 \pm 0.23$ <sub>A</sub>	$26.9 \pm 0.35$ <sub>B</sub>
$Gln_{inc}$ (mmol / L)	$5.97 \pm 0.66$ <sub>A</sub>	$6.18 \pm 0.11$ <sub>A</sub>	$6.12 \pm 0.01$ <sub>A</sub>	$6.13 \pm 0.20$ <sub>A</sub>
$Glu_{max}$ (mmol / L)	$1.41 \pm 0.08$ <sub>A</sub>	$1.69 \pm 0.07$ <sub>A</sub>	$1.28 \pm 0.14$ <sub>A</sub>	$3.10 \pm 0.33$ <sub>B</sub>
$AcM_{max}$ (mg/mL)	$0.78 \pm 0.15$ <sub>A</sub>	$1.52 \pm 0.12$ <sub>B</sub>	$3.55 \pm 0.29$ <sub>C</sub>	$3.75 \pm 0.033$ <sub>C</sub>
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$0.035 \pm 5.42 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.030 \pm 5.22 \times 10^{-4}$ <sub>A</sub>	$0.036 \pm 1.40 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.032 \pm 2.43 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>
$Y_{x/Glc}$ ( $cel \cdot pmol^{-1}$ )	$0.13 \pm 3.78 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.12 \pm 9.23 \times 10^{-3}$ <sub>B</sub>	$0.30 \pm 7.15 \times 10^{-2}$ <sub>C</sub>	$0.18 \pm 9.39 \times 10^{-3}$ <sub>D</sub>
$Y_{Lac/x}$ ( $pmol \cdot cel^{-1}$ )	$4.31 \pm 9.05 \times 10^{-1}$ <sub>A</sub>	$4.71 \pm 2.47 \times 10^{-1}$ <sub>A</sub>	$4.13 \pm 6.2 \times 10^{-1}$ <sub>A</sub>	$5.93 \pm 2.94 \times 10^{-1}$ <sub>B</sub>
$Y_{x/Gln}$ ( $cel \cdot pmol^{-1}$ )	$0.89 \pm 1.94 \times 10^{-1}$ <sub>A</sub>	$0.76 \pm 6.5 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.92 \pm 1.76 \times 10^{-1}$ <sub>A</sub>	$0.77 \pm 6.67 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>
$Y_{Glu/x}$ ( $pmol \cdot cel^{-1}$ )	$0.19 \pm 64.45 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.09 \pm 3.42 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.08 \pm 5.39 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.09 \pm 1.00 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>
$Y_{Glu/Gln}$ ( $mmol \cdot mmol^{-1}$ )	$0.16 \pm 5.75 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.06 \pm 1.98 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.07 \pm 4.07 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.07 \pm 1.28 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>
$Y_{Lac/Glc}$ ( $mmol \cdot mmol^{-1}$ )	$0.54 \pm 6.99 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.55 \pm 2.73 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$1.22 \pm 1.34 \times 10^{-1}$ <sub>B</sub>	$1.08 \pm 4.06 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>
$q_{Glc}$ ( $pmol \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$0.28 \pm 5.51 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.25 \pm 1.67 \times 10^{-2}$ <sub>B</sub>	$0.12 \pm 2.26 \times 10^{-2}$ <sub>C</sub>	$0.18 \pm 1.37 \times 10^{-2}$ <sub>D</sub>
$q_{Lac}$ ( $pmol \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$0.15 \pm 1.05 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.14 \pm 4.89 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.15 \pm 1.76 \times 10^{-2}$ <sub>A</sub>	$0.19 \pm 7.39 \times 10^{-3}$ <sub>B</sub>
$q_{Gln}$ ( $pmol \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$0.04 \pm 3.63 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.04 \pm 3.58 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.04 \pm 5.62 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>	$0.04 \pm 2.52 \times 10^{-3}$ <sub>A</sub>
$q_{Glu}$ ( $pmol \cdot cel^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$0.006 \pm 6.58 \times 10^{-4}$ <sub>A</sub>	$0.003 \pm 9.76 \times 10^{-4}$ <sub>B</sub>	$0.003 \pm 1.82 \times 10^{-3}$ <sub>B</sub>	$0.003 \pm 3.71 \times 10^{-4}$ <sub>B</sub>
$q_{AcM}$ ( $pg \cdot cel^{-1} \cdot día^{-1}$ )	$2.0 \pm 0.09$ <sub>A</sub>	$3.8 \pm 0.18$ <sub>B</sub>	$6.6 \pm 0.05$ <sub>C</sub>	$7.3 \pm 0.72$ <sub>C</sub>



**Figura 23. Producción de AcM de la sub clona B con y sin Aza en cultivo en lote.** A) Concentración de AcM producido. B) Velocidades específicas de producción del AcM. Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 130 rpm. Hubo significancia estadística en la qP con un valor p<0.5



**Figura 24. Producción de AcM de la sub clona C con y sin Aza en cultivo en lote.** A) Concentración de AcM producido. B) Velocidades específicas de producción del AcM. Los valores promedio (puntos) se presentan con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 130 rpm. No hubo significancia estadística en la qP con un valor p>0.5

El cambio más significativo se encontró en la producción del AcM de la sub clona B con un aumento estadísticamente significativo en su qP de casi el doble, para llegar

a  $3.84 \pm 0.18 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ , (**Fig. 23**) a diferencia de la sub clona C cuya  $q_P$  no mostró un aumento estadísticamente significativo y se situó en de  $7.30 \pm 0.72 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  al adicionar 5Aza2 (**Fig. 24**). El bajo incremento de la productividad para la sub clona C puede deberse a que ya era una clona altamente productora con un bajo porcentaje de metilación, el cual permite la expresión óptima del transgén y/o de enzimas claves para la producción y transporte del anticuerpo (Weinguny et al., 2020). Por lo tanto, pareciera que disminuir aún más dicho porcentaje de metilación no resulta tan benéfico como para la sub Clona B. Otro factor importante es una posible desmetilación del promotor del transgén de una o ambas cadenas del AcM que favorece su expresión (Qi et al., 2019) o bien al cambio en la expresión de proteínas transportadoras que permiten una mejor secreción de este (Kaneyoshi et al., 2018).

El sitio de metilación es un factor muy importante en la productividad y heterogeneidad celular. Esto lo vemos al comparar las  $q_P$  de ambas sub clonas después del tratamiento con el inhibidor, donde, la nueva producción de la sub clona B no alcanza la productividad de la sub clona C, a pesar de presentar el mismo porcentaje de 5mC. Esto implica que la distribución particular de la metilación en el ADN, determina la respuesta de la célula tanto en su productividad como en su fisiología y metabolismo, lo que hace aún más interesante un estudio de secuenciación para determinar los sitios de metilación y si existen diferencias puntuales entre estas dos sub clonas.

Además de lo anterior el sitio de integración juega un papel importante en la productividad de las células. Si bien la integración del transgén es un evento completamente azaroso, se ha reportado que existen regiones “susceptibles” a la integración como lo reportan Li et al. (2016). Este grupo encontró que existe una mayor probabilidad de integración del transgén en la región terminal del cromosoma 1 (1q 13), cerca de la región telomérica donde los niveles de metilación son menores y por tanto la expresión del transgén fue más estable, similar a lo reportado por Yoshikawa y colaboradores en el 2000. Sin embargo, no todas las clonas de tipo telomérico (aquellas donde el transgén se insertó en o cerca de los telómeros) son estables y productivas debido a la elevada tasa de recambio. Drouza y colaboradores (2006) reportan que la integración también puede ocurrir y

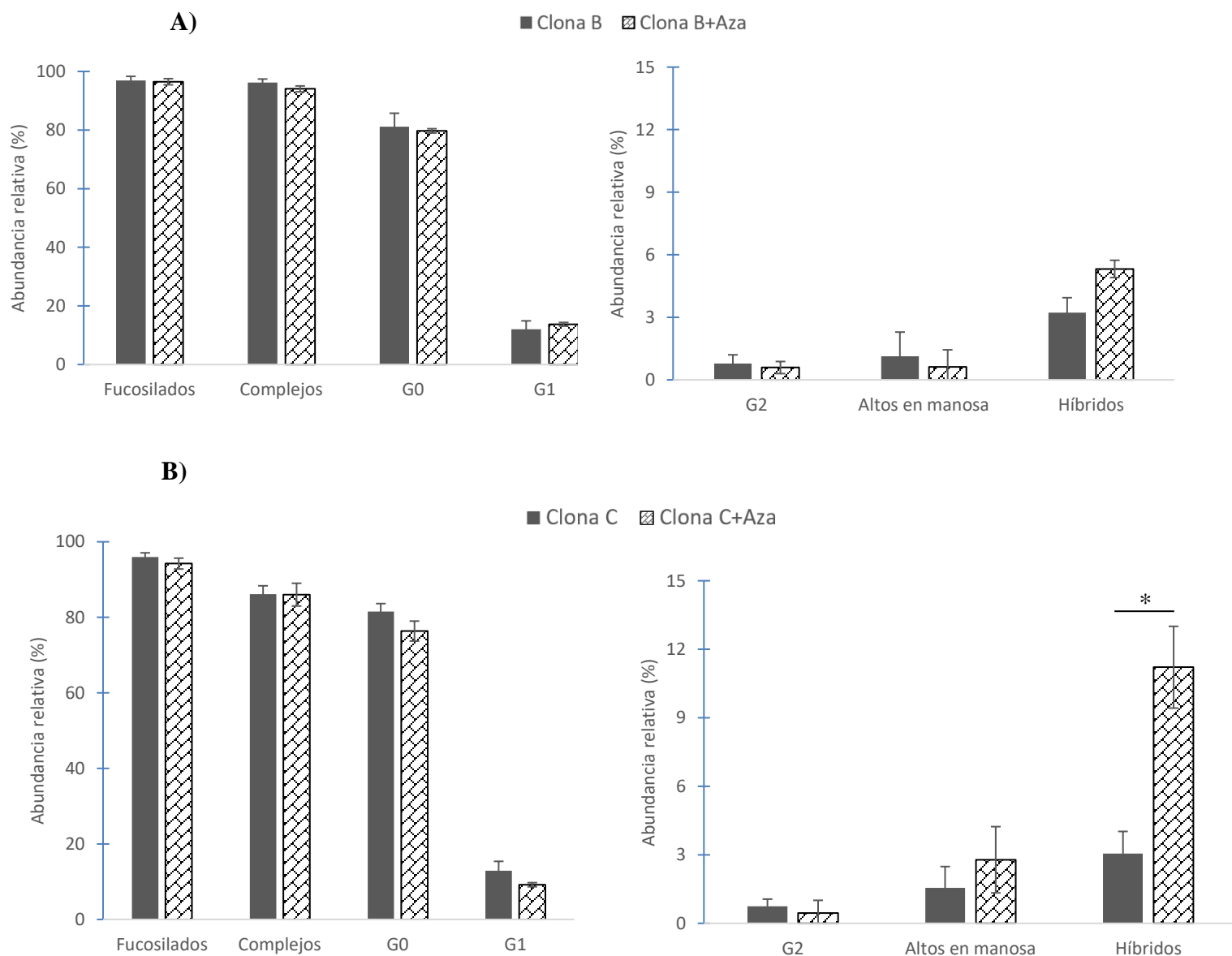
sostenerse en otras regiones por ejemplo del cromosoma Z3 y Z4 donde se ha observado alta variabilidad en la metilación (Braga et al., 2015).

Esto se debe a una integración en, o cerca de, una región de heterocromatina que da como resultado un silenciamiento de la expresión, mientras que la integración en una región de eucromatina mantendrá activa la transcripción del transgén (Kwaks & Otte, 2006). Sin embargo, resulta interesante que Li et al (2016) observaron una situación diferente donde de todas las posibles regiones de integración, de hacerlo cercano a los extremos en regiones ricas en heterocromatina resultará en una mayor estabilidad al transgén y permitirá que se exprese durante mayor tiempo en comparación con un contexto genético de eucromatina, mucho más susceptible a recombinación y reordenamiento cromosómico. Esto indica que otros factores, además del sitio de integración y el grado de metilación del ADN, tienen un impacto en la expresión transgénica y por tanto en las características cinéticas y bioquímicas celulares.

Para finalizar, en la **Fig. 25** se muestra el perfil de N-glicosilación del AcM modelo producido en presencia del inhibidor 5Aza2. No hubo cambio estadísticamente significativo en las estructuras encontradas ni en su abundancia relativa, con excepción de un aumento significativo en la abundancia de estructuras híbridas para la subclona C. Se ha reportado que para células humanas el efecto del 5Aza2 puede no ser aleatorio (Tabolacci et al., 2016; Suzuki et al., 2002) aunque no se ha reportado nada para células CHO. Sin embargo, el trabajo de Suzuki y colaboradores (2002) reportó 51 genes que se encuentran regulados bajo el efecto de 5Aza2, la mayoría de esto implicados en vías de señalización, crecimiento y diferenciación celular, pero ninguno de ellos aporta a la vía de N-glicosilación, lo que puede explicar porque no se encontraron diferencias significativas con el tratamiento para la mayoría de las estructuras propuestas del AcM.

Por otro lado, en el caso de las estructuras híbridas para la subclona C, se ha reportado en la literatura que una mayor presencia de este oligosacárido con N-acetilglucosamina terminal puede aumentar la tasa de eliminación del AcM en suero, probablemente disminuyendo su efectividad. Por esta razón también sería recomendable realizar estudios de farmacocinética del AcM para determinar si este

aumento de estructuras, principalmente para la sub clona C tiene algún efecto negativo (Szabo, et al., 2022; Ambrogelly et al., 2018).



**Figura 25. Perfil de N-glicosilación de las sub clonas B y C en cultivo en lote con y sin Aza.**

A) Sub clona B. Izquierda: abundancia relativa de estructuras fucosiladas, complejas con y sin galactosa terminal. Derecha: estructuras con dos galactosas terminales, altos en manosa e híbridas.

B) Sub clona C. Izquierda: abundancia relativa de estructuras fucosiladas, complejas con y sin galactosa terminal. Derecha: estructuras con dos galactosas terminales, altos en manosa e híbridas. Los valores promedio se muestran con la desviación estándar (barras) de cultivos por triplicado en matraz a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 130 rpm. Hubo significancia estadística en la abundancia relativa de las estructuras híbridas para la subclona C con un valor p<0.5

## X. Conclusiones

La hipometilación en el ADN provocó cambios en la fisiología y metabolismo de subclonas de células CHO recombinantes, mostrando que la metilación del ADN sí juega un papel significativo en su heterogeneidad, incluyendo en la producción del AcM modelo para el que fueron diseñadas; exponiendo que la inhibición de la DNMT1 puede aumentar la productividad en subclonas altamente metiladas sin alterar su perfil de metilación cumpliendo los objetivos planteados de este trabajo.

Además, se concluye que:

- Existen diferencias cinéticas y fisiológicas en las cuatro sub clonas estudiadas en términos de su rendimiento de biomasa respecto a la glucosa y glutamina como fuentes de carbono y nitrógeno, así como en la producción de metabolitos de desecho y en la producción del AcM modelo.
- De las cuatro sub clonas estudiadas la sub clona C fue la mejor productora de AcM como se aprecia en su productividad específica con un valor de  $6.6 \pm 0.05 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ , mientras que la sub Clona B, fue la menor con una producción de  $2.0 \pm 0.09 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ . En comparación, las sub clona A y D que presentan una producción similar del AcM modelo e intermedia a las sub clonas B y C.
- A pesar de que el efecto de 5Aza2 puede no ser aleatorio sobre ciertos genes, no hubo diferencias en el perfil de N-glicosilación del AcM modelo producido por las cuatro sub clonas estudiadas. Por lo que la maquinaria de glicosilación no se ve afectada por el inhibidor. Esto se observa en las estructuras propuestas y en la abundancia relativa de cada uno de los oligosacáridos que van desde estructuras simples como paucimanas hasta estructuras más complejas con y sin fucosa con galactosa terminal.
- Existe una diferencia en el grado de metilación del ADN entre las sub clona B y C, siendo la sub clona B la que tiene un mayor grado de 5mC con un valor de  $69.65 \pm 5.98\%$  lo que implica un mayor silenciamiento del ADN, y por tanto una menor expresión del transgén y/o proteínas y enzimas claves para el procesamiento del ARN mensajero y del AcM.
- El uso del inhibidor 5Aza2 disminuyó el grado de metilación de las sub clonas B y C a valores de  $45.46 \pm 7.8\%$  y  $42.13 \pm 6.75\%$ , respectivamente. A pesar de esto la

productividad específica entre ambas sub clonas fue diferente por lo que se puede argumentar que el sitio de metilación también juega un papel importante en la heterogeneidad celular, aunque esto no se determinó en el presente estudio.

- Se logró un incremento en la productividad específica del AcM modelo mediante el tratamiento con el inhibidor 5Aza2 para la sub clona B, alcanzando un valor de  $3.84 \pm 0.18 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ , pero no para la sub clona C. Probablemente esto se deba a que la sub clona C ya era una muy buena productora con un bajo grado de metilación antes del tratamiento, lo que probablemente resulta en una posibilidad reducida de favorecer aún más la expresión del transgén, así como el procesamiento del AcM.



## XI. Perspectivas

- Sería interesante evaluar el nivel de expresión del transgén del AcM mediante q-RTPCR, para determinar si existe un fenómeno de silenciamiento por metilación a nivel del promotor que repercuta en la productividad inicial observada. Esto servirá para acotar aún más cual la región metilada o desmetilada podría ser responsable de la heterogeneidad observada de las sub clonas estudiadas en este trabajo.
- Igualmente, sería relevante desde el punto de vista del bioproceso determinar si el efecto del inhibidor 5Aza2 es permanente o transitorio, y de ser así, cuánto tiempo se mantiene el fenotipo encontrado. Esto se podrá determinar mediante cultivos a distinto pase celular después del tratamiento con 5Aza2 evaluando la productividad del AcM modelo, con la finalidad de aprovechar su efecto benéfico más adelante en cultivos a mayor escala o cultivos continuos.
- Para ampliar las conclusiones se podrá probar otros métodos para cambiar el grado de metilación del genoma como métodos no químicos; por ejemplo, mediante RNA de interferencia. Esto como estrategia para aumentar la producción específica de la sub clonas al no verse comprometido su crecimiento por la citotoxicidad del 5Aza2.
- Sería deseable también realizar la secuenciación del metiloma completo para las sub clonas estudiadas con el fin de poder encontrar las regiones y genes que pudieran estar sujetos a un silenciamiento por metilación y que sean claves para la diferencia en la heterogeneidad encontrada.
- Finalmente, evaluar si el fenotipo encontrado para las subclonas estudiadas puede darse también desmetilando de forma dirigida el transgén u otras proteínas involucradas en el procesamiento y transporte mediante el sistema CRISPR-Cas podría arrojar resultados relevantes tanto para el entendimiento de los mecanismos epigenéticos como desde el punto de vista práctico para mejorar los bioprocesos.

## XII. Referencias

1. Alhuthali, S., Kotidis, P., & Kontoravdi, C. (2021). Osmolality effects on CHO cell growth, cell volume, antibody productivity and glycosylation. *Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3290. doi: 10.3390/ijms22073290.
2. Altamirano, C., Ollanes, A., Becerra, S., Cairo, J. J., & Godia, F. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 547 – 556. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.023.
3. Altamirano, C., Paredes, C., Cairó, J. J., & Gódia, F. (1999). Glucose and Glutamine Replacement for the enhancement of fed-batch processes using CHO cells. *Animal Cell Technology: Productis from Cells, Cells as Products*, 95 – 97. doi: 10.1007/0-306-46875-1\_21.
4. Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J. J., & Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress*, 16(1), 69 – 75. doi: 10.1021/bp990124j.
5. Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J. J., & Godia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: Substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology*, 110(2), 171 – 179. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.02.004.
6. Ambrogelly, A., Gozo, S., Katiyar, A., Dellatore, S., June, Y., Bhat, R., Liu, H. (2018). Analytical comparability study of recombinant monoclonal antibody therapeutics. *mAbs*, 10 (4), 513 – 538. doi: 10.1080/19420862.2018.1438797.
7. Amini, S., Jacobsen, A., Ivanova, O., Linjnzaad, P., Heringa, J., Holstege, F. C. P., ... Kemmeren, P. (2019). The ability of transcription factors to differentially regulate gene expression is a crucial component of the mechanism underlying inversion, a frequently observed genetic interaction pattern. *PLoS Computational Biology*, 15(5), e1007061. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007061.

8. Annibaldi, A., & Widmann, C. (2010). Glucose metabolism in cancer cells. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13(4), 466 – 470. doi: 10.1097/mco.0b013e32833a5577.
9. Arnold, J., Wormald, M., Sim, R., Rudd, P. & Dwek, R. (2007). The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*, 25(1): 21 – 50. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.14170.
10. Attwood, J. T., Yung, R. L., & Richardson, B. C. (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(2), 241 – 257. doi: 10.1007/sc00018-002-8420-z.
11. Barnes, L., Moy, N., & Dickson, A. (2006). Phenotypic Variation During Cloning Procedures: Analysis of the Growth Behavior of Clonal Cell Lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(3): 530 – 537. doi: 10.1002/bit.20856.
12. Behjousiar, A., Konyoravdi, C., & Polizzi, K. M. (2012). In situ monitoring of intracellular glucose and glutamine in CHO cell culture. *PLoS ONE*, 7(4), e34512.
13. Bhutia, Y., & Ganapathy, V. (2016). Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863 (10): 2531 – 2529. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.017.
14. Bollati-Fangolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H. S., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2008). Temperature reduction in cultures of HGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnology Progress*, 21(1), 17 – 21. doi: 10.1021/bp049825t.
15. Browne, S., & Al-Rubeai, M. (2007). Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends in Biotechnology*, 25(9), 425 – 432. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.07.002.
16. Borja, G. M., Meza Mora, E., Barrón, B., Gosset, G., Ramírez, O. T., & Lara, A. R. (2012). Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode, *Microbial Cell Factories*, 11(1), 132.

17. Boune, S., Hu, P., Epstein, A. L., & Khawli, L. A. (2020). Principles of N-linked glycosylation variations of IgG-based therapeutics: pharmacokinetic and functional considerations. *Antibodies*, 9(2), 22. doi: 10.3390/antib9020022.
18. Braga, E. A., Khodyrev, D. S., Loginov, V. I., Pronia, I. V., Sechenko, V. N., Dmitriev, A. A., Kushlinkskii, N. E. (2015). Methylation in the regulation of the expression of chromosome 3 and microRNA genes in clear-cell renal cell carcinomas. *Russian Journal of Genetics*, 51(6), 566 – 581. doi: 10.1134/s1022795415050026.
19. Bulté, D. B., Palomares, L. A., Parra, C. G., Martínez, J. A., Contreras, M. A., Noriega, L. G., & Ramírez, O. T. (2020). Overexpression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier reduces lactate production and increases recombinant protein productivity in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*. doi: 10.1002/bit.27439.
20. Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3): 283 – 291. doi: 10.1007/s00253-005-1980-8.
21. Cartwright, J. (2016). CHO Cell Genetic Instability: From Transfection to Stable Cell Line. Thesis Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. Department of Chemical and Biological Engineering. University of Sheffield.
22. Chen, K., Li, D., Li, H., Li, B., Wang, R., Jiang, L., Fang, J. (2019). Improved recombinant protein production by regulation of transcription and protein transport in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Letters*. 41: 719 – 732. doi: 10.1007/s10529-019-02681-7.
23. Cheung, P. & Lau, P. (2005). Epigenetic Regulation by Histone Methylation and Histone Variants. *Molecular Endocrinology*, 19(3): 563 – 573. doi: 10.1210/me.2004-0495.
24. Chusainow, J., Yang, Y., Yeo, J., Toh, P., Asvadi, P., Wong, N., & Yap, M. (2008). A Study of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines: What Makes a Stable High Producer? *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4): 1182 – 1196. doi: 10.1002/bit.22158.
25. Clausen H, Wandall H., Steentoft C., Stanly, P. & Schnaar, R. (2017). Glycosylation Engineering. En: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology 3rd edition*. Cold Spring Harbor (NY): Cold

- Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 56. doi: 10.1101/glycobiology.3e.056.
26. Cuisset, L., Tichonicky, L., Jaffray, P., & Delpech, M. (1997). The effects of sodium butyrate on transcription are mediated through activation of protein phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (39), 24148 – 24153. doi: 10.1074/jbc.272.39.24148.
27. Dangi, A. K., Sinha, R., Dwivedi, S., Gupta, S. K., & Shukla, P. (2018). Cell line techniques and gene editing tools for antibody production: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 9. doi: 10.3389/fphar.2018.00630.
28. Davidson, S., Crowther, P., Raley, J., & Woodcock, D. (1992). Cytotoxicity of 5-Aza-2'-deoxycytidine in a mammalian cell system. *European Journal of Cancer*, 28 (2-3), 362-368. doi: 10.1016/s0959-8049(05)80054-1.
29. Davies, S., Lovelady, C., Grainger, R., Racher, A., Young, R. & James, D. (2012). Functional Heterogeneity and Heritability in CHO Cell Populations. *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (1): 260 – 274. doi: 10.1002/bit.2461.
30. Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., & Hitchen, P. (2010). Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *International Journal of Microbiology*, 1-14. doi: 10.1155/2020/148178.
31. Derouazi, M., Marinet, D., Besuchet, N., Flaction, R., Wicht, M., Bertschinger, M., Hacker, D.L., Beckman, J.S., & Wurm, F.M. (2006). Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(4): 1069 – 1077. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.111.
32. Dickson, A. (2009). Importance of Genetic Environment for Recombinant Gene Expression. *Cell Line Development*, 83 – 96. doi: 10.1007/978-90-481-2245-5\_4.
33. Dovgan, T., Golghanlyani, V., Zurlo, F., Hatton, D., Lindo, V., Turner, R., ... Cui, T. (2021). Targeted CHO cell engineering approaches can reduce HCP-related enzymatic degradation and improve mab product quality. *Biotechnology and Bioengineering*. doi: 10.1002/bit.27857.
34. Feichtinger, J., Hernández, I., Fischer, C., Hanscho, M., Auer, N., Hackl, M., ... Borth, N. (2016). Comprehensive genome and epigenome characterization

- of CHO cells in response to evolutionary pressures and over time. *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 2241 – 2253. doi: 10.1002/bit.25990.
35. Fernández-Martell, A., Johari, Y. B., & James, D. C. (2017). Metabolic phenotyping of CHO cells varying in cellular biomass accumulation and maintenance during fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 115 (3): 645 – 660. doi: 10.1002/bit.26485.
36. Fuentes, L. G., Lara, A. R., Martínez, L. M., Ramírez, O., T., Martínez, A., Bolivar, F., & Gosset, G. (2013). Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microbial Cell Factories*, 12 (1), 42. doi: 10.1186/1475-2859-12-42.
37. Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., & Sinskey, A. J. (1986). Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(9), 1376 – 1389. doi: 10.1002/bit.260280912.
38. Ghorbaniaghdam, A., Chen, J. K., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an In silico metabolomic platform. *PLoS ONE*, 9(3), 18. doi: 10.1371/journal.pone.0090832.
39. Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4 – 13. doi: 10.1038/hdy.2010.54.
40. Goh, J. & Ng, S. (2017). Impact of host cell line choice on glycan profile. *Critical Reviews In Biotechnology*, 38 (6), 851 – 867. doi: 10.1080/07388551.2017.1416577.
41. Gupta, S. K., Srivastava, S. K., Sharma, A., Nalage, V. H. H., Salvi, D., Kushwaha, H., Shukla, P. (2017). Metabolic engineering of CHO cells for development of robust protein production platform. *PLoS ONE*, 12(8), e0181455. doi: 10.1371/journal.pone.0181455.
42. Hartley, F., Walker, T., Chung, V., & Morten, K. (2018). Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(8), 1890 – 1930. doi: 10.1002/bit.26603.

43. Hernandez, I., Dhiman, H., Klanert, G., Jadhav, V., Auer, N., Hanscho, M., ... Borth, N. (2018). Epigenetic regulation of gene expression in Chinese Hamster Ovary cells in response to the changing environment of a batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(3), 677 – 692. doi: 10.1002/bit.26891.
44. Hidalgo, M. (2010). Estudio transcripcional de las vías de N-glicosilación en células de ovario de hámster chino (CHO) cultivadas en condiciones de hipotermia moderada. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
45. Hubbers, J. W., & Buyel, J., F. (2021). On the verge of the market – Plant factories for the automated and standardized production of biopharmaceuticals. *Biotechnology Advances*, 46, 107681. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107.
46. Jarrel, K. F., Ding, Y., Meyer, B. H., Albers, S.-V., Kaminski, L., & Eichler, J. (2014). N-linked glycosylation in archea: a structural, functional, and genetic analysis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 304 – 341. doi: 10.1128/mnbr.00052-13.
47. Kaneyoshi, K., Uchiyama, K., Onitsuka, M., Yamano, N., Koga, Y., & Omasa, T. (2018). Analysis of intracellular IgG secretion in Chinese hamster ovary cells to improve IgG production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. doi: 10.1016/j.biosc.2018.06.018.
48. Kawabe, Y., Makitsubo, H., Kameyama, Y., Huang, S., Ito, A., & Kamihira, M. (2011). Repeated integration of antibody genes into a pre-selected chromosomal locus of CHO cells using an accumulative site-specific gene integration system. *Cytotechnology*, 64(3), 267 – 279. doi: 10.1007/s10616-011-9397-y.
49. Kim, J. Y., Kim, Y.-G., & Lee, G. M. (2021). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93 (3), 917 – 930. doi: 10.1007/s00253-011-3758-5.
50. Konno, Y., Kobayashi, Y., Takahashi, K., Takahashi, E., Sakae, S., Wakitani, M., Hosoi, S. (2011). Fucose content of monoclonal antibodies can be

- controlled by culture medium osmolarity for high antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cytotechnology*, 64(3): 249 – 265. doi: 10.1007/s10616-011-9377-2.
51. Kwaks, T. & Otte, A. (2006). Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends in Biotechnology*, 24(3): 137 – 142. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.01.007.
52. Kuo, C. C., Chiang, A. W., Shamie, I., Samoudi, M., Guitierrez, J. M., & Lewis, N. E. (2018). The emerging role of systems biology for engineering protein production in CHO cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 51, 64 – 69. doi: 10.1016/j.copbio.2017.11.015.
53. Lai, T., Yang, Y., & Ng, S. (2013). Advances in Mammalian Cell Line Development for Recombination Protein Production. *Pharmaceuticals*, 6: 579 – 603. doi: 10.3390/ph6050579.
54. Lakshmanan, M., Kok, Y., Lee, A., Kyriakopoulos, S., Lim, H., Teo, G., Poh, S., Tang, W., Hong, J., Tan, A., Bi, X., Ho, Y., Zhang, P., Ng, S. & Lee, D. (2019). Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits. *Biotechnology and Bioengineering*. doi: 10.1002/bit.27014.
55. Lattenmayer, C., Loeschel, M., Steinfeldner, W., Trummer, E., Mueller, D., Schriegl, K., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H., & Kunert, R. (2006) Identification of transgene integration loci of different highly expressing recombinant CHO cell lines by FISH. *Cytotechnology*, 51: 171 – 182. doi: 10.1007/s10616-006-9029-0.
56. Lee, J., Park, J., Ha, T., Samoudi, M., Lewis, N., Palsson, B., Kildegaard, H. & Lee, G. (2018). Revealing key determinants of clonal variation in transgene expression in recombinant CHO cells using targeted genome editing. *ACS Synthetic Biology*, 7(12): 2867 – 2878. doi: 10.1021/acssynbio.8b00290.
57. Le, H., Kabbur, S., Pollastrini, L., Sun, Z., Mills, K., Johnson, K., ... Hu, W. (2012). Multivariate analysis of cell culture bioprocess data- Lactate consumption as process indicator. *Journal of Biotechnology*, 162 (2-3), 210 – 223. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.021.



58. Li, S., Gao, X., Peng, R., Zhang, S., Fu, W., & Zou, F. (2016). FISH-Based Analysis of clonally derived CHO cell populations reveals high probability for transgene integration in a terminal region of chromosome 1 (1q13). *PLoS ONE*, 11 (9): e0163893. doi: 10.1371/journal.pone.0163893.
59. Li, J., Wong, C. L., Vijayasankaran, N., Hudson, T., & Amanullah, A. (2011). Feeding lactate for CHO cell culture processes: impact on culture metabolism and performance. *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (5), 1173 – 1186. doi: 10.1002/bit.24389.
60. Locasale J.W., Cantley, L.C.(2011). Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metabolism*, 14(4), 443 – 451. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.014.
61. López-Meza, J., Araíz-Hernández, D., Carillo-Cocom, L. M., López-Pacheco, F., Rocha-Pizaña, M. del R., & Alvarez, M. M. (2015). Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naïve and infliximab producer CHO cells. *Cytotechnology*, 68(4), 1287 – 1300. doi: 10.1007/s10616-015-9889-2.
62. Mascarenhas, J. X., Korokhov, N., Burger, L., Kassim, A., Turter, J., Miller, D., Kayser, K. J. (2016). Genetic engineering of CHO cells for viral resistance to minute virus of mice. *Biotechnology and Bioengineering*, 114 (3), 576 – 588. doi: 1002/bit.26186.
63. Momparler, R. L. (2005). Epigenetic therapy of cancer with 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Seminars in Oncology*, 32(5), 443 – 451. doi: 10.1053/j.seminoncol.2005.07.008.
64. Naderi, F., Hashemi, M., Bayat, H., Mohammadian, O., Pourmaleki, E., Etemadzadeh, M., H., & Rahimpour, A. (2018). The augmenting effects of the tDNA insulator on stable expression of monoclonal antibody in chinese hamster ovary cells. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, 37(5), 200 – 206. doi: 10.1089/mab.2018.0015.
65. National Research Council (NRC) (US) (1999). Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. Monoclonal Antibody Production. Washington (DC): National Academies Press (US); Introduction. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100188/>

66. Noh, S., Shin, S., & Lee, G. (2018). Comprehensive characterization of glutamine synthetase-mediated selection for the establishment of recombinant CHO cells producing monoclonal antibodies. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-23720-9.
67. Nothfat, H., & Szymanski, C. M. (2013). Bacterial Protein N-glycosylation: new perspectives and applications. *Journal of Biological Chemistry*, 288 (10), 6912 – 6920. doi: 10.1074.jbc.r112.417857.
68. Nyabi, O., Naessens, M., Haigh, K., Gembrarska, A., Goossens, S., Maetens, M., De Clercq, S., Drogat, B., Haenebalcke, L., Bartunkova, S., De Vos, I., De Craene, B., Karimi, M., Berx, G., Nagy, A., Hilson, P., Marine, J-C, & Haigh, J. (2009). Efficient mouse transgenesis using Gateway-compatible ROSA26 locus targeting vectors and F1 hybrid ES cells. *Nucleic Acids Research*, 37(7): 55 – 55. doi: 10.1093/nar/gpk112.
69. Orellana, A., Marcellin, E., Schulz, B., Nouwens, A., Gray, P., & Nielsen, L. (2015). High-Antibody-Producing Chinese Hamster Ovary Cells Up-Regulate Intracellular Protein Transport and Glutathione Synthesis. *Journal of Proteome Research*, 14(2): 609 – 618. doi: 10.1021/pr501027c.
70. Palomares L. A., Joosten C. E., Hughes P. R., Granados R. R. & Shuler M. L. (2003). Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnology Progress* 19: 185-192.
71. Partha, M., & Rakesh, S. (2004). DNA methylation and cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(22): 4632 – 4642.
72. Pereira, S., Kildegaard, H. F., & Andersen, M. R. (2018). Impact of CHO metabolism on cell growth and protein production: an overview of toxic and inhibiting metabolites and nutrients. *Biotechnology Journal*, 13(3), 1700499. doi: 10.1002/Ubiot.201700499.
73. Pilbrough, W., Munro, T. P., & Gray, P. (2009). Intraclonal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells. *PLoS ONE*, 4(12), e8432. doi: 10.1371/journal.pone.0008432.
74. Qi, R., Zhang, X., Xie, Y., Jiang, S., Liu, Y., Liu, X., Shao, G. (2019). 5-Aza-2+deoxycytidine increases hypoxi tolerance-dependent autophagy in mouse

- neuronal cells by initiating the TSC1/mTOR pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109219. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109219.
75. Raju, T. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current Opinion in Immunology*, 20(4): 471 – 478. doi: 10.1016/j.coi.2008.06.007.
76. Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., & Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *Journal of Cellular Physiology*, 220(1), 144 – 154. doi: 10.1002/jcp.21744.
77. Sarkar, S., Abujamra, A., Loew, J. Forman, L., Perrine, S & Faller, D. (2011). Histone deacetylase inhibitors reverse CpG methylation by regulating DNMT1 through ERK signaling.
78. Schneider, K., Fuchs, C., Dobay, A., Rottach, A., Qin, W., Wolf, P., ...Shermelleh, L. (2013). Dissection of cell cycle-dependent dynamics of Dnmt1 by FRAP and diffusion-coupled modeling. *Nucleic Acids Research*, 41(9), 4860 – 4876. doi: 10.1093/nar/gkt191.
79. Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125 (2), S41-S52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
80. Selvi, R., Angayarkannu, N., Asma, B., Seethalakshmi, T., & Vidhya, S. (2010). Amino acids influence the glucose uptake through GLUT4 in CHO-K1 cells under high glucose conditions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 344 (1-2), 43 – 53. doi: 10.007/s11010-010-0527-1.
81. Serrato, J. A., Palomares, L. A., Meneses-Acosta, A., & Ramírez, O. T. (2004). Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(2), 176 – 188. doi: 10.1002/bit.20232.
82. Sharif, J. & Koseki, H. (2018). Hemimethylation: DNA`s lasting odd couple. Stably inherited DNA hemimethylation regulates chromatin interaction and transcription. *Science*, 359 (6380), 1102 – 1103. doi: 10.1126/science.aat0789.

83. Shemelz, K., Sattlr, N., Wager, M., lübbert, M., Dörken, B., & Tamm, I. (2004). Induction of gene expression by 5-Aza-2`deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and independent mechanisms, *Leukemia*, 19 (1), 103 – 111. doi: 10.1038/sj.leu.2403552.
84. Schwarz, F., & Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(5): 576 – 582. doi: 10.1016/j.sbi.2011.08.005.
85. Sharma, S., Byrne, H. & O`Kennedy, R. (2016). Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays In Biochemistry*, 60(1): 9 – 18. doi: 10.1042/ebc20150002.
86. Singh, S., Kumar, N., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, Preeti, & Chung, V. (2017). Monoclonal Antibodies: A Review. *Current Clinical Pharmacology*, 12. doi: 10.2174/1574884712666170809124728.
87. Sissolak, B., Lingg, N., Sommeregger, W., Striedner, G. & Vorauer-Uhl, K. (2018). Impact of mammalian cell culture conditions on monoclonal antibody charge heterogeneity: an accessory monitoring tool for process developmet. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. doi: 10.1007/s10295-019-02202-5.
88. Sumit, M., Dolatshahi, S., Chu A., Cote, K., Scarcelli, J., Marshall, J., Cornell, R., Weiss, R., Lauffenburger, D., Mulukutla, B. & Figueroa, B. (2019). Dissecting N-glycosylation dynamics in chinese hamster ovary cells fed-batch cultures using time course omics analyses. *iScience*, 12: 102 - 120. doi: 10.1016/j.isci.2019.01.006.
89. Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M.P., Baylin, S. B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genetics*, 31 (2), 141 – 149. doi: 10.1038/ng892
90. Szabo, M., Filep, C., Nagy, M., Sarkozy, D., Szigeti, M., Sperling, E., Csanky, E. & Guttman, A. (2022). N-glycosylation structure – function characterization of amalizumab, an anti-asthma biotherapeutic product. *Journal of*

- Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 290 (2022) 114483. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114483.
91. Tabll, A. (2015). Monoclonal antibodies: Principles and applications of immunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. *World Journal of Hepatology*, 7(22): 2369. doi: 10.4254/wjh.v7.i22.2369.
92. Tabolacci, E., Mancano, G., Lanni, S., Palumbo, F., Goracci, M., Ferré, F., Neri, G. (2016). Genome-wide methylation análisis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA methylation in fragile X syndrome cells. *Epigenetics & Chromatin*, 9(1), doi: 10.1186/s13072-016-0060-x.
93. Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J.D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(7), 2013 – 2024. Doi:10.1002/bit.24858.
94. Tihanyi, B., & Nyitray, L. (2021). Recent advances in CHO cell lines development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies*. doi: 10.1016/j.ddtec.2021.02.003.
95. Torres, M., Zuñiga, R., Gutierrez, M., Vergara, M., Collazo, N., Reyes, J., ... Altamirao, C. (2018). Mild hypothermia upregulates myc and xbp1s expression and improves anti-TNF $\alpha$  productions in CHO cells. *PLOS ONE*, 13(3), e0194510. doi: 10.1371/journal.pone.0194510.
96. Van Berkel, P., Gerritsen, J., Perdok, G., Valbjorn, J., Vink, T., van Winkel, J., & Parren, P. (2009). N-Linked glycosilation is an important parameter for optimal selection of cell lines producing biopharmaceutical human IgG. *Biotechnology Progress*. 25(1): 244 – 251. doi: 10.1002/btpr.92.
97. Vcelar, S., Jadhav, V., Melchr, M., Auer, N., Hrdina, A., Sagmeister, R., Heffner, K., Puklowski, A., Betenbaugh, M., Wenger, T., Leisch, F., Baumann, M. & Borth, N. (2017). Karyotype variation of CHO host cell lines over time in culture characterized by chromosome counting and chromosome painting. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(1): 165 – 173. doi: 10.1002/bit.26453.
98. Veith, N., Siehr, H., MacLeod, R. & Reamon-Buettner, S. (2016). Mechanisms underlying epigenetic and transcriptional heterogeneity in Chinese hamster

- ovary (CHO) cell lines. *BMC Biotechnology*, 16(1). doi: 10.1186/s12896-016-0238-0.
99. Vishwanathan, N., Le, H., Jacob, N. M., Tsao, Y.-S., Ng, S.-W., Loo, B., ... Hu, W.-S. (2014). Transcriptome dynamics of transgene amplification in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(3), 518 – 528. doi: 10.1002/bit.25117.
100. Wada, R., Matsui, M., & Kawasaki, N. (2018). Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms. *MAbs*. doi: 10.1080/19420862.2018.1551044.
101. Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803 (11), 1231 – 1243. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013.
102. Wahrheit, J., Niklas, J. & Heinzle, E. (2014). Metabolic control at the cytosol-mitochondria interface in different growth phases of CHO cells. *Metabolic Engineering*, 23: 9 – 21. doi: 10.1016/j.ymben.2014.02.001
103. Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical bechmarck 2018. *Nature Biotechnology*, 36(12), 1136 – 1145. doi: 10.1038/nbt.4305.
104. Weidle, U.H., Buckel, Po., & Weinberg, J. (1988). Amplified expression constructs for human tissue-type plasminogen activator in Chinese hamster ovary cells: instability in the absence of selective pressure. *Gene*, 66(2): 193 – 203. doi: 10.1016/0378-1119(88)90356-3.
105. Weinguny, M., Eisenhut, P., Klanert, G., Virgolini, N., Marx, N., Jonsson, A., Ivansson, D., Lövgren, A. & Borth, N. (2020). Random epigenetic modulation of CHO cells by repeated knockdown of DNA methyltransferases increases population diversity and enables sorting of cells with higher production capacities. *Biotechnology and Bioengineering*, 1 – 13. doi: 10.1002/bit.27493.
106. Wingfield, P. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 6.1.1 – 6.1.35. doi: 10.1002/0471140864.ps.0601s80.

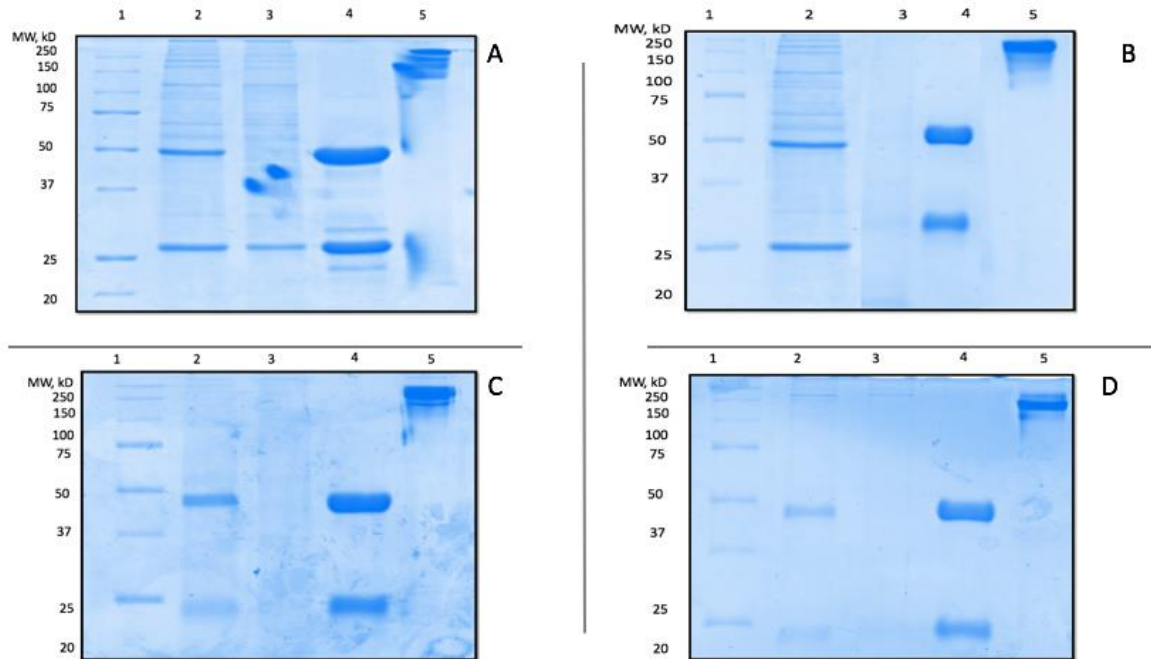
107. Wipperman, A., Klausning, S., Rupp, O., Albaum, S. P., Büntemeyer, H., Noll, T., & Hoffrogge, R. (2013). Establishment of a CpG island microarray for analyses of genome-wide DNA methylation in Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 579 – 589. doi: 10.1007/s00253-013-5282-2.
108. Wipperman, A., & Noll, T. (2017). DNA methylation in CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 258, 206 – 210. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.08.005.
109. Wipperman, A., Rupp, O., Brinkrolf, K., Hoffrogge, R., & Noll, T. (2015). The DNA methylation landscape of Chinese hamster ovary (CHO) DP-12 cells. *Journal of Biotechnology*, 199, 38 – 46. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.02.014.
110. Wong, D. C. F., Wong, N. S. c., Goh, J. S. Y., May, L. M., & Yap, M. G. S. (2010). Profiling N-glycosylation gene expression in CHO cell fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 516 – 528. doi: 10.1002/bit.22828.
111. Wuhrer, M., Stam, J. C., van de Geijn, F. E., Koeleman, C. A. M., Verrips, C. T., Dolhain, R. J. E. M., Deelder, A. M. (2007). Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics*, 7 (22), 4070 – 4081. doi: 10.1002/pmic.200700289.
112. Wurn, F. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11): 1393 – 1398. doi: 10.1038/nbt1026.
113. Wurn, F. & Hacker, David. (2013). First CHO Genome. *Nature Biotechnology*, 29(8): 718 – 719.
114. Wurn, F., & Wurn, M. (2017). Cloning of CHO cells, productivity and genetic stability A discussion. *Processes*, 5(4),20. doi: 10.3390/pr5020020.
115. Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, N. E., Pan, S., Cai, Z., Liu, X., Wang, J. (2011). The genomic sequence of the chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature Biotechnology*, 29(8), 735 – 741. doi: 10.1038/ntb.1932.
116. Yang, Y., Chusainow, J., & Yap, M. (2010). DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines. *Journal of Biotechnology*, 147: 180 – 185. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.04.004.

117. Yoon, S. K., Choi, S. L., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2004). Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 °C. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(3), 345 – 356. doi: 10.1002/bit.20353.
118. Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Ogura, Y., Oi, D., Omasa, T., Katakura, Y., Kishimoto, M., & Suga, K. (2000). Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnology Progress*, 16(5): 710 – 715. doi: 10.1021/bp000114e.
119. Yuk, I. H., Russell, S., Tang, Y., Hsu, W. T., Mauger, J. B., Aulakh, R. P. S., Joly, J. C. (2014). Effects of copper on CHO cells: cellular requirements and product quality considerations. *Biotechnology Progress*, 31(1), 226 – 238. doi: 10.1002/btpr.2004.
120. Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., & Wurm, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology*, 30(2), 238 – 245. doi: 10.1016/j.nbt.2012.05.021.
121. Zheng, K., Bantong, C., & Bayer, R. (2011). The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *mAbs*, 3(6), 568 – 576. doi: 10.4161/mabs.3.6.17922.
122. Zuñiga, F. (2017). Efecto del potencial redox en la sialidación de un anticuerpo monoclonal. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.



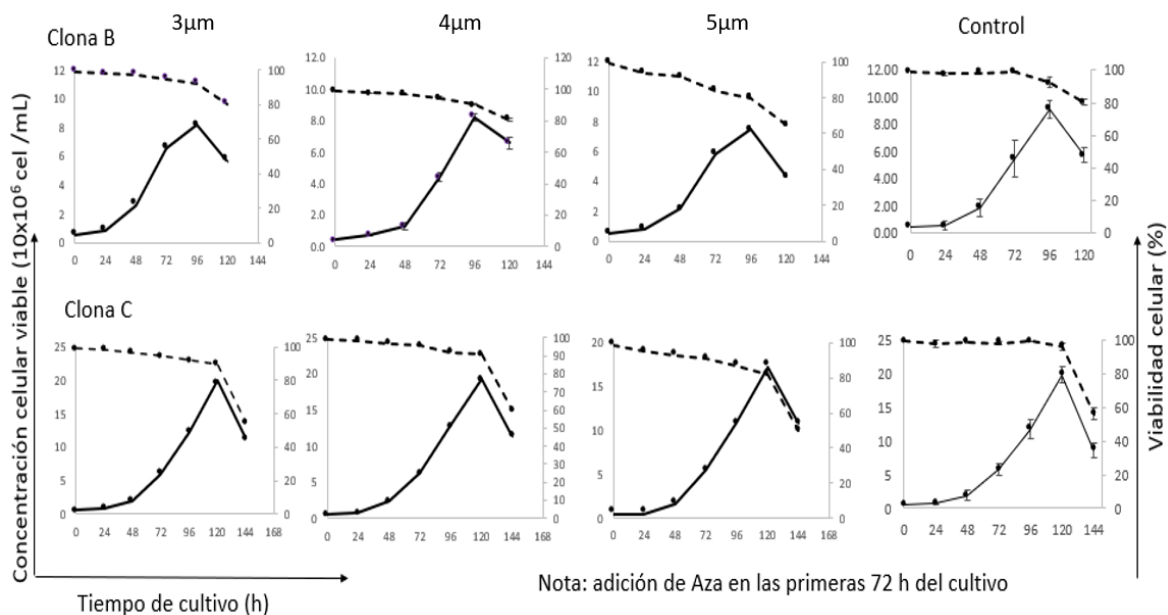
## XIII. Anexos

En la **Figura S1** se muestran los geles de electroforesis obtenidos de los AcM de las Clonas A-D. Se observan las bandas esperadas alrededor de 50 y 25 kD correspondientes a las cadenas pesada y ligera, respectivamente; así como la banda a 150 kD en la muestra sin reducir. Esto indica que la purificación se hizo correctamente.

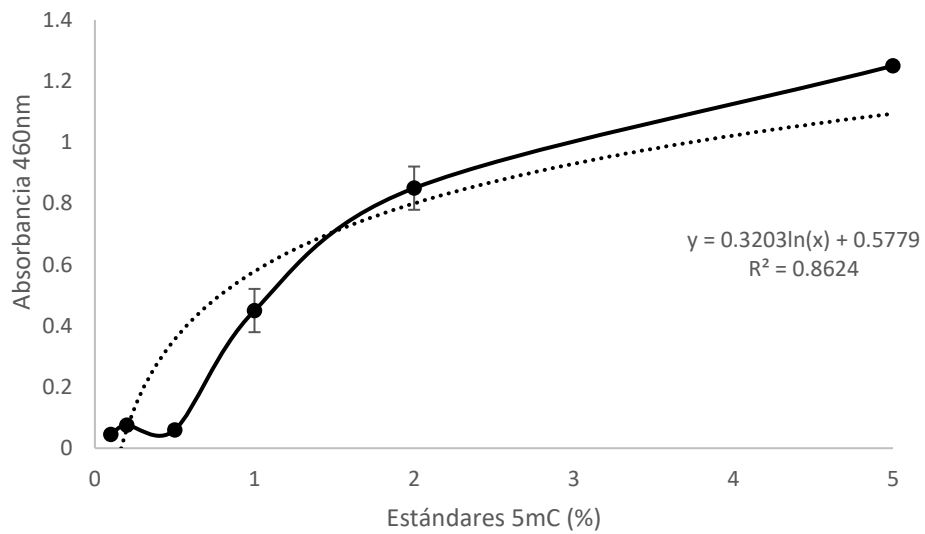


**Figura S1. Purificación del AcM.** Geles de SDS-PAGE para el AcM producido por las clonas A-D. Leyenda: 1) Marcador de peso molecular; 2) Sobrenadante sin purificar; 3) Muestra no adherida a la columna; 4) AcM purificado (muestra reducida); 5) AcM purificado (muestra sin reducir).

Para encontrar la dosis mínima y necesaria del inhibidor 5-Aza-2deoxitidina se realizaron cinéticas de crecimiento a distinta concentración, evaluando la tasa de crecimiento y viabilidad. Se determinó que 4  $\mu\text{M}$  era la dosis adecuada ya que no comprometía el crecimiento de la célula.



**Figura S2. Concentración mínima y necesaria del inhibidor.** Para determinar la dosis mínima y necesaria del inhibidor que no comprometiera la viabilidad ni el crecimiento de las células, se probaron distintas concentraciones para la sub clona B y C: 3  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ . Se decidió trabajar con 4  $\mu\text{M}$ .



**Figura S3. Curva estándar de porcentaje de metilación del ADN.** Para determinar el grado de metilación del ADN se construyó esta curva con estándares con distintos grados de metilación: 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2% y 5%. Se utilizó la ecuación de la recta para calcular los porcentajes de metilación de las sub Clonas estudiadas.