

EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD Y GLICOSILACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL PRODUCIDO EN CÉLULAS DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO (CHO)

Martha Hidalgo, Norma Valdez-Cruz, Vanessa Hernández, Noemí Flores, O. Tonatiuh Ramírez
 Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3, Cuernavaca, Morelos
 62250, MÉXICO. Fax (52) (777) 3138811, e-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: *N*-glicosilación, disminución de la temperatura, anticuerpo monoclonal.

Introducción. La disminución de la temperatura de cultivo por debajo de 37°C, se ha considerado un método eficiente para incrementar la productividad específica de glicoproteínas con aplicación terapéutica, producidas en células CHO (1). No obstante, el impacto sobre la glicosilación de dichas proteínas ha sido pobremente estudiado.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la disminución de la temperatura (30 y 32°C), sobre la *N*-glicosilación del anticuerpo monoclonal anti-IL8 (MabIL8) producido en células CHO, y sobre algunos genes representativos de la vía de síntesis de *N*-glicanos.

Metodología. Línea: CRL-12444 (ATCC). Cultivos: spinner flask, 5% de CO₂, 60 rpm, medio CDM4-CHO (Hyclone)+insulina 2µg/mL+ MTX 200nM. Concentración y viabilidad celular: exclusión con azul de tripano y Coulter Counter. Metabolitos: analizador bioquímico YSI. Cuantificación y purificación de Mab: ELISA y cromatografía de afinidad (2). Patrón de glicosilación: digestión con PNGasa F, marcaje con 2 aminobenzamida y análisis por HPLC (2). Análisis transcripcional por RT-PCR.

Resultados y discusión. La disminución de temperatura de 37°C a 32 ó 30°C, se realizó durante la fase exponencial de cultivos escalonados, determinando que el tiempo de cambio óptimo a 32°C fue a las 24 h y a las 72 h a 30°C, pues presentaron el metabolismo más eficiente (Tabla 1). Durante el crecimiento a baja temperatura (escalonados y controles) los parámetros cinéticos disminuyeron, la viabilidad de los cultivos se prolongó hasta por 2 semanas y la productividad específica de MabIL8 fue 17% mayor respecto al control a 37°C (Tabla 1). Doce genes codificantes para diferentes enzimas de *N*-glicosilación fueron evaluados en los cultivos: controles a 37°C, 32°C, 30°C y escalonados a las 48 y 72 horas, mediante RT-PCR. El análisis se realizó 24 h después del cambio de temperatura usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y como gen control β -tubulina. Los genes correspondientes a etapas reguladoras del proceso de *N*-glicosilación (DPM1 y DPM2) y a etapas tardías de la vía, fueron sensibles a la temperatura; en particular disminuyó la expresión de los genes responsables de la galactosilación, fucosilación y transferencia de NAcGlc (Fig. 1). El patrón de glicosilación del Mab-IL8 a 37°C, consistió en 2 *N*-

glicanos biantenarios complejos no bisectados, con estructuras G1 (15.6%), G2 (6%) y G0 (50.6%). Datos preliminares mostraron que la disminución de la temperatura afectó el patrón de glicosilación del MabIL8.

Tabla 1. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos control y escalonados

Cultivo	$\mu(h^{-1})$	Glucosa		L-lactato		$Y_{lac/glc}$	Glutamina		Glutamato		qp
		Y_{xs}	qs	Y_{xs}	qs		Y_{xs}	qs	Y_{xs}	qs	
37°C	0.017	76.45	220.23	0.027	448.67	2.04	461.76	36.46	0.612	10.34	0.612
32°C	0.011	74.34	147.97	0.027	302.36	2.04	415.69	26.46	0.812	12.69	0.552
48h	0.021	76.05	282.25	0.050	843.95	3.81	365.75	30.07	0.559	11.06	0.621
	0.010	59.31	161.59	0.014	133.61	0.83	575.32	19.12	0.250	2.96	
30°C	0.008	57.69	131.87	0.032	240.57	1.82	379.78	20.03	0.855	10.28	0.358
	0.020	63.14	314.60	0.047	937.42	2.98	260.05	76.39	0.840	16.64	0.605
48 h	0.006	89.66	66.05	0.020	117.55	1.78	417.83	14.17	0.506	3.17	
	0.018	76.87	234.17	0.024	432.03	1.92	338.69	54.61	0.617	11.09	
72 h	0.006	50.43	120.32	0.018	109.04	0.91	525.21	11.55	0.424	2.46	0.715

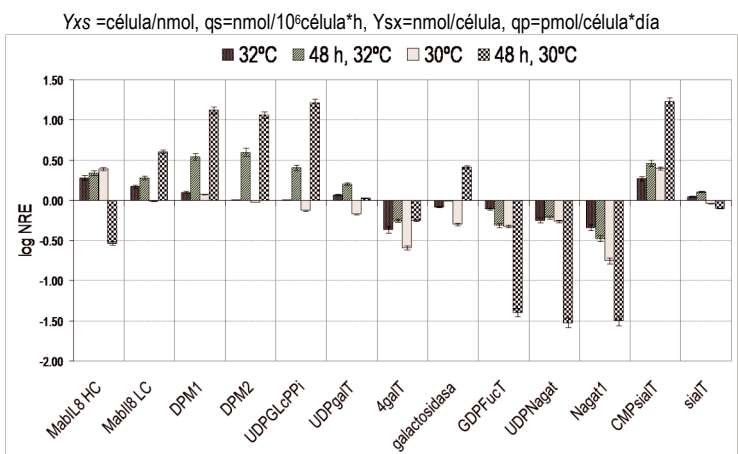


Fig. 1. Nivel relativo de expresión (NRE) de genes involucrados en la vía de *N*-glicosilación del Mab-IL8 a 30° y 32°C

Conclusiones. La disminución de la temperatura en los cultivos escalonados mejoró la productividad de MabIL8 como se ha reportado (1); sin embargo, los cambios observados en la expresión de glicosiltransferasas sugieren modificaciones importantes en el patrón de glicosilación de Mab, que están siendo verificadas mediante el análisis de los patrones de glicosilación

Agradecimientos. DGAPA/UNAM (IN-224409).

Bibliografía.

1. Yoon K.S., Song J., Lee G.M. (2003) Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of EPO in CHO cells *Biotechnol. Bioeng.* 82(3), 289-298
2. Serrato J, Palomares L, Meneses-Acosta A, Ramírez O (2004). Heterogeneous conditions in dissolved O₂ affect *N*-glycosylation but not productivity of a Mab in hybridoma cultures. *Biotechnol.* 88; 176-188.