

# EFFECTO DE LAS OSCILACIONES DE OXIGENO DISUELTO SOBRE LA GLICOSILACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PRODUCIDOS POR CULTIVO *IN VITRO* DE HIBRIDOMAS

J. Antonio Serrato, Laura A. Palomares y Octavio Tonatiuh Ramírez.

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Av. Universidad 2001 Col Chamilpa, Cuernavaca, Mor. C.P. 62250. Fax (777) 3138811, tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: *hibridomas, anticuerpos monoclonales, glicosilación*

**Introducción.** Dada su amplia capacidad para realizar exquisitas modificaciones postraduccionales como la glicosilación, las células animales son preferidas para la producción de glicoproteínas con fines terapéuticos. Sin embargo durante el desempeño de estos cultivos a gran escala, muy bajas velocidades de agitación y aireación son empleadas, desencadenando la presencia de gradientes o limitaciones de las principales variables de cultivo como es el caso del oxígeno disuelto (OD). Dado que el proceso de glicosilación de proteínas es el resultado de la acción secuencial de múltiples enzimas en el Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi, las condiciones medioambientales de cultivo son determinantes en el patrón de glicosilación obtenido en la glicoproteína de interés. El patrón de glicosilación por su parte es el responsable de la calidad de la proteína ya que de él depende la actividad biológica o su tiempo de residencia en el organismo. A la fecha se desconoce el impacto que tiene la presencia de heterogeneidades medioambientales de cultivo sobre los patrones de glicosilación de las glicoproteínas.

En este trabajo se analizó, mediante una estrategia de escalamiento descendente (1), el efecto de la presencia de gradientes de OD sobre los patrones de glicosilación de un Anticuerpo Monoclonal (AcM) producido por cultivo *in vitro* de hibridomas murinos.

**Metodología.** Línea celular: hibridomas murinos BCF2 productores del AcM contra la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffman. Medio de cultivo: DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino. Las oscilaciones de OD se realizaron, en un biorreactor de 250 mL, mediante la manipulación de los flujos de O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> a través de un sistema computarizado y un algoritmo de control proporcional, que permitió realizar oscilaciones sinusoidales de OD con un eje, amplitud y período de oscilación determinado. El pH se controló por medio de un flujo de CO<sub>2</sub> y un buffer de carbonatos en el medio de cultivo. La viabilidad y concentración celular se midieron por tinción con azul de tripano y un contador electrónico de partículas, respectivamente. La glucosa, glutamina y lactato se midieron mediante un multianalizador enzimático. El AcM se purificó por cromatografía de afinidad en un FPLC. La determinación de los patrones de glicosilación del AcM se realizaron mediante HPLC de fase normal acoplado a un detector de fluorescencia. Se utilizó un gradiente de formato de amonio para separar a los oligosacáridos que fueron previamente liberados del AcM por digestión enzimática con la

endoglicosidasa F (PNGasaF) y marcados en su extremo reductor con el colorante fluorescente 2-aminobenzimida.

**Resultados y Discusión.** Se probaron cuatro períodos de oscilación (800, 1600, 6400 y 12800s) manteniendo constante el eje y amplitud de oscilación (7% y +/-7% de OD, respectivamente), de manera que las células experimentaran períodos alternantes bajo condiciones óptimas y bajo condiciones limitantes de OD. Como control se desarrollaron cultivos a 10 % de OD constante (con respecto a sat. con aire). Los cultivos a OD oscilante mostraron, tanto en el consumo, la producción de metabolitos, así como en las cinéticas de crecimiento y producción de AcM, un comportamiento muy similar a los cultivos control. Con respecto a los patrones de glicosilación determinados, se observó un aumento de las estructuras altas en manosa (estructuras no deseadas) conforme los períodos de oscilación aumentaron, así como una disminución en las estructuras de tipo complejo -G0, G1 y G2- (Cuadro.1).

Cuadro. 1. Efecto de diferentes períodos de oscilación de OD en las estructuras de glicanos presentes en el AcM.

Tipo de glicano (%)	OD- Cte	800s	1600s	6400s	12800s
Paucimanchosa	7.9	15	0.6	0.7	4.5
G0	22.1	16.1	19.6	17.4	14.4
G1	38.7	37.3	35.8	33.5	28.8
G2	17.4	22	20.4	18.9	17.8
Alto en manosa	13.9	9.6	23.6	29.4	34.5

**Conclusiones.** Las oscilaciones de OD que se experimentaron no tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento y la producción de AcM por hibridomas. Sin embargo sí existe una clara influencia de la presencia de estas condiciones oscilantes de OD sobre el proceso de glicosilación de los AcM al encontrarse un aumento de estructuras altas en manosa, así como una disminución en las estructuras complejas. Lo anterior es un indicativo de un procesamiento incompleto de los oligosacáridos, el cual pudiera deberse a una inactivación de las enzimas encargadas de llevar a cabo la glicosilación compleja.

**Agradecimientos.** DGAPA IN-216100, CONACyT 33348-B y CONACyT NC-230. Al apoyo técnico de M. en C. Vanessa Hdz.

**Bibliografía.**

1. Palomares, L. A. y Ramírez, O. T. (1999). "Biorreactor Scale-Down". En: *The Encyclopedia of Cell Technology*. Spier, R.E. (ed). John Wiley and Sons, Inc. 174-201.