

EFFECTO DEL SUERO FETAL BOVINO EN EL CRECIMIENTO DE HIBRIDOMAS Y SOBRE EL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DEL AcM PRODUCIDO.

J. Antonio Serrato, Vanessa Hernández, Sandino Estrada M. 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: *electroforesis capilar, anticuerpos monoclonales, glicosilación*

Introducción. Los cultivos de células de mamíferos son preferentemente utilizados para producir proteínas de uso terapéutico debido a su habilidad para realizar modificaciones postraduccionales como la glicosilación. La inmunogenicidad y las propiedades farmacocinéticas de las glicoproteínas dependen de su patrón de glicosilación, mismo que puede verse afectado al modificar la composición del medio de cultivo (1).

En este trabajo se analizó el efecto que tiene el uso de medios libres de suero fetal bovino (SFB) sobre el crecimiento de hibridomas, sobre la producción de un Anticuerpo Monoclonal (AcM) y sobre su patrón de glicosilación.

Metodología. Se cultivaron hibridomas murinos productores de un AcM contra una toxina de alacrán. Se usaron tres diferentes medios de cultivo: DMEM-10%SFB (Sigma), medio libre de suero (SFM, Gibco) y medio completamente definido (CDM, Gibco). Los cultivos se llevaron a cabo en frascos T-75 con 15mL de medio a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. La concentración celular se estimó usando un contador electrónico de partículas. La viabilidad fue estimada por exclusión con azul de tripano. La glucosa, glutamina y lactato se cuantificaron en un multianalizador enzimático. El AcM se purificó por cromatografía de afinidad. Los glicanos asociados al AcM fueron analizados por electroforesis capilar (CE-LIF) (2).

Resultados y Discusión. El uso de medios libres de SFB (ambos SFM y CDM) no afectó el crecimiento de los hibridomas cuando se comparó con cultivos en medio suplementado con SFB. Sin embargo la concentración de los inóculos tuvo que ser incrementada 2 veces (0.2 en vez de 0.1x10⁶ cel mL⁻¹) para obtener el desarrollo del cultivo (*Figura 1*). Se observó que en los medios libres de SFB, las células perdieron la capacidad para adherirse al frasco y tendieron a formar agregados en suspensión. Los perfiles de glicosilación del AcM producido por BCF2 cultivados en medio libre de SFB mostraron una disminución importante en el porcentaje de estructuras con dos galactosas terminales (G2) (*Tabla 1*).

Conclusiones. La sustitución de los componentes del SFB por compuestos definidos no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de los hibridomas. Sin embargo sí existe una clara influencia de la diferencia de composición entre cada medio de cultivo sobre la disponibilidad de precursores para llevar a cabo de manera eficiente el proceso de glicosilación de los AcM.

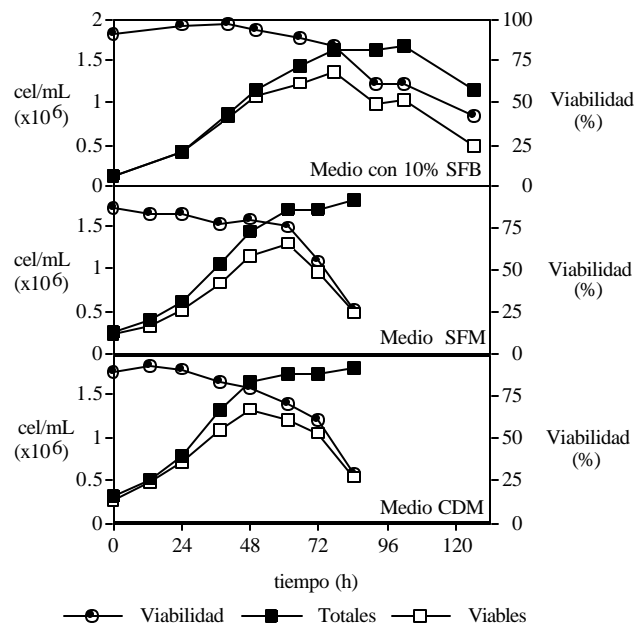


Figura 1. Efecto del medio de cultivo en el crecimiento de los hibridomas murinos.

Tabla 1. Porcentaje de estructuras de glicanos presentes en el AcM al cultivar hibridomas en diferentes medios de cultivo.

Estructura propuesta (%)	DMEM 10% SFB	CDM	SFM
G0	11.8	18.9	25.8
G1	28	24.6	31.4
G2	17.8	7.0	5.8
Otras	42.4	49.5	37.1

Agradecimientos. CONACyT 33348-B y CONACyT NC-230, el apoyo técnico de Alhondra Solares y la discusión de resultados de la Dra. Laura Palomares.

Bibliografía.

- 1.- Goochee, C. and Monica, T. (1990). Environmental effects on protein glycosylation. *Biotechnology*. Vol (8):421-427.
- 2.- Ma, S. and Nashabeh, W. (1999). "Carbohydrate analysis of a chimeric recombinant monoclonal antibody by Capillary

Electrophoresis with Laser-Induced fluorescence detection". *Anal. Chem.* Vol (72):5185-5192.