



RECUPERACIÓN PRIMARIA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL UTILIZANDO POLIELECTROLITOS: EFECTOS SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DEL PRODUCTO

Arturo Gómez-Aquino, Vanessa Hernández y Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich.
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM.
Cuernavaca, Mor. Av. Universidad #2001 Col. Chamilpa C.P. 62250. Tel: (777) 3291617.
e-mail: itzcoatl@ibt.unam.mx

Palabras clave: anticuerpo monoclonal (AcMo), clarificación, polielectrolitos.

Introducción. La primera operación en un tren de purificación de anticuerpos monoclonales, también conocida como etapa de clarificación, tiene como objetivo la remoción de impurezas sólidas de modo que al final de esta fase se obtenga un sobrenadante libre de partículas que pueda ser procesado en las operaciones subsiguientes, como por ejemplo etapas cromatográficas. Típicamente, la microfiltración de flujo tangencial, filtración profunda y en particular centrifugación, son las operaciones utilizadas en conjunto para clarificar suspensiones de cultivos celulares. Una alternativa para mejorar tales procesos es aumentar el tamaño de las partículas pequeñas por medio del uso de polielectrolitos. Por otra parte, la glicosilación se ha convertido en el centro de interés de la industria biofarmacéutica como medida de control de la eficacia y calidad de fármacos biológicos. Este trabajo tiene como objetivo identificar los efectos del uso de polielectrolitos sobre la cantidad recuperada y calidad de un AcMo modelo.

Metodología. Se realizaron cultivos de células CHO-K1 en medio CDM4CHO[®] (Hyclone) suplementado con 6 mM de L-glutamina (Sigma), 2.1 g/L de NaHCO₃ (JT Baker) y 0.1 g/L de Pluronic F-68 (Sigma). El cultivo se mantuvo durante 96 h, tiempo en el cual la viabilidad comienza a decrecer (<90%) y se obtiene una concentración celular de 1.8x10⁶ cel/mL. Se adicionó el AcMo (IgG1) omalizumab (Xolair[®], Novartis) purificado (1 mg/mL). El polielectrolito utilizado fue polietilenimina (polímero catiónico de 25 kDa, Sigma) a 100 ppm. La cuantificación de proteína total se realizó por el método de Bradford (1), AcMo por ELISA directo (detección anti-IgG-peroxidasa, Sigma) y el DNA por PicoGreen. El AcMo colectado fue purificado utilizando un equipo de cromatografía de baja presión con una columna de sefarsa - proteína A (2). Se determinó el patrón de N-glicosilación por HPLC-Fase Normal (3).

Resultados. Al término del cultivo (denotado como Tiempo 0 en la Tabla 1) se adicionó el IgG y se cuantificaron los componentes del medio de cultivo. Después de 35 min las células fueron sedimentadas por acción gravitacional y el sobrenadante fue recolectado (Tiempo final). Se obtuvo una reducción del contenido celular de un 97.5%, posteriormente se filtró para

remover los remanentes celulares. Se purificó el anticuerpo obteniéndose una pureza superior al 95%. El anticuerpo puro fue procesado para determinar su patrón de N-glicosilación en el cual se encontraron las siguientes glicofomas: 1. A1; 2. FA1; 3. A2G0; 4. A2G0F; 5. M5; 6, 7,8. A21F; 9.A2G2F (Figura1). En este caso ninguna glicofoma fue afectada por la adición del polielectrolito. Este resultado es consistente con la naturaleza del AcMo (glicanos neutros). En la Figura 2 se muestra en gel de electroforesis cada una de las etapas de purificación.

Tabla 1. Análisis de componentes en sobrenadante.

Componente	Tiempo 0	Tiempo Final	% Reducción
DNA (RFU)	1366±5.2	28±1.3	98%
HCP (µg/mL)	91.2±3.8	83±3.1	9%
IgG (mg/mL)	1±0.05	0.95±0.03	5%

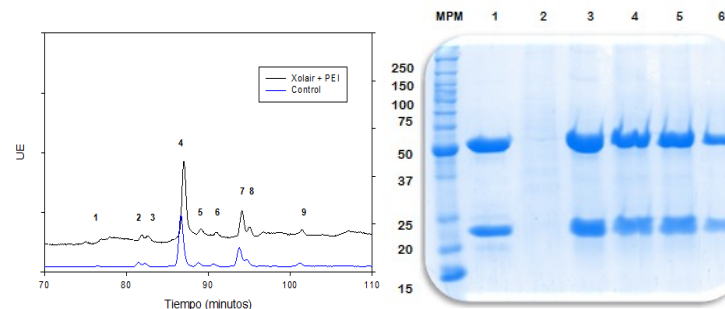


Fig. 1. Perfil de N-glicosilación de Xolair[®].

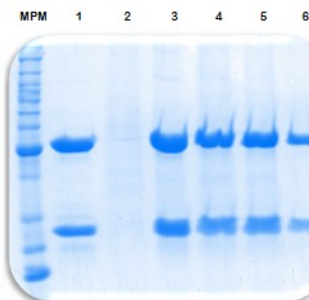


Fig. 2. SDS-PAGE al 10%.

1. Xolair[®] (Vial), 2. Sobrenadante,
3. Sobrenadante + PEI + Xolair T0,
4. Sobrenadante + PEI + Xolair Tf,
5. Filtrado, 6. Purificado

Conclusiones. Se demostró que el uso de polietilenimina en la recuperación primaria de un anticuerpo monoclonal es selectivo dado que reduce niveles de contaminantes (HCP y DNA) sin afectar la composición de glicofomas del producto.

Agradecimiento. A la empresa PROBIOMED por donar amablemente la línea celular CHO-K1. Financiamiento CONAcYT-Salud-126663 y PAPIIT-UNAM-224409.

Bibliografía.

1. Bradford M. (1976). *Anal Biochem* (72):248-254.
2. Kunkel J, Jan D, Jamieson J. y Butler M. (1998). *Journal of Biotech.* (62):55-71.
3. Guile G, Rudd P, Wing D, Prime S y Dwek R. (1996). *Anal Biochem.* (240):210-226.