PERFIL DE N-GLICOSILACION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL PRODUCIDO POR CULTIVO DE CELULAS SINCRONIZADAS

Jocelyne E. Mendoza Pérez[1]; Vanessa Hernández Rodríguez[2]; Laura A. Palomares[2] y José A. Serrato[1].
1. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Ciudad de México. C.P. 14080.
2. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca. C.P. 62210.
serratoiner@gmail.com.

Palabras clave: glicosilación, ciclo celular, anticuerpo monoclonal.

Introducción. Los Anticuerpos Monoclonales (AcM) terapéuticos son el producto farmacéutico biotecnológico más exitoso y lucrativo a nivel global (1). Sin embargo, son glicoproteínas estructuralmente complejas, con perfil de glicosilación heterogéneo, el cual es un atributo crítico de calidad en virtud de que impacta directamente en la actividad biológica de la molécula (2). Es necesario conocer los factores que conducen a dicha heterogeneidad con la finalidad de producir en el futuro AcM más homogéneos y específicos. En el presente trabajo se determinó el perfil de N-glicosilación de un AcM producido por células de mamífero cultivadas de forma sincronizada a través de las diferentes fases del ciclo celular (CS), en comparación con el cultivo tradicional no sincronizado (CNS).

Metodología. Línea celular de hibridoma murino (BCF2) que produce un AcM del tipo IgG1. Los cultivos se realizaron por triplicado, en suspensión, volumen de 50 mL, 37 ^{o}C, 5 % CO_2, 120 RPM, en medio CD Hybridoma Gibco® suplementado con 8 mM de L-Glu y una $[Xv]_{inicial}$ de $1x10^6$ cel/mL. La sincronización celular se realizó mediante elutriación centrífuga a contracorriente (3) y la determinación de ciclo celular mediante la cuantificación de ADN celular por citometría de flujo. El AcM fue purificado por cromatografía de afinidad a proteína A y el análisis de N-glicosilación se realizó por cromatografía líquida de interacción hidrofílica (4).

Resultados. En la Fig. 1 se muestra el perfil de N-glicosilación del AcM producido en sendos modos de cultivo. En ambas condiciones la glicosilación fue altamente heterogénea; se identificaron un total de 23 estructuras de oligosacárido que comprendió tanto estructuras altas en manosa como estructuras complejas. El porcentaje de las estructuras complejas representativas de AcM (A2G0, A2G1 y A2G2), en su conjunto, fue mayoritario en ambos casos. Sin embargo, el CS, en comparación el CNS, mostró un incremento en el porcentaje de las estructuras altas en manosa, acompañado de una disminución del porcentaje de las estructuras complejas (Tabla 1).

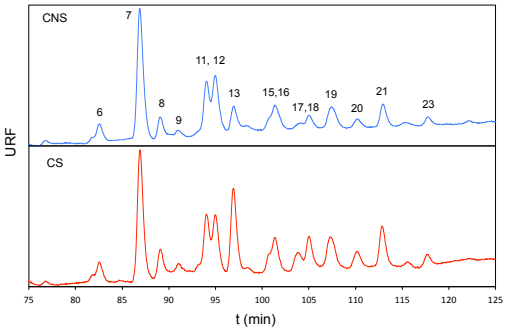

Figura 1. Perfiles de N-glicosilación del AcM producido en CNS y CS.

Tabla 1. Porcentaje relativo de N-glicanos mayoritarios identificados en CNS y CS

Pico No	GU's	Estructura propuesta	CNS %	CNS sd	CS %	CS sd
6	5.5	A2G0	3.6	0.7	3.0	0.4
7	5.9	A2G0F	24.6	1.3	21.0	5.4
8	6.2	MAN5	4.9	0.4	4.2	0.1
11	6.7	A2G1(1,6)F	11.0	0.7	9.0	1.6
12	6.8	A2G1(1,3)F	12.2	0.7	10.1	1.5
13	7.1	MAN6	5.7	0.5	9.8	2.1
14	7.2	A2G2	1.9	0.8	1.1	0.6
16	7.6	A2G2F	6.5	0.6	6.3	1.4
17	8.0	MAN7	1.9	0.5	3.2	0.6
20	8.9	MAN8	2.7	0.2	3.2	0.8
21	9.3	MAN9	4.5	0.4	6.2	1.2

Conclusiones. El modo de cultivo sincronizado vs el cultivo tradicional no sincronizado, no disminuyó la heterogeneidad de la glicosilación del AcM. Sin embargo, en los CS se determinó un incremento en el porcentaje de las estructuras altas en manosa, indicativas de un procesamiento incompleto del oligosacárido y la disminución del porcentaje de las estructuras con mayor procesamiento o complejas.

Agradecimientos. CONACyT CB-2010 155653. Al Dr. L. Possani por la donación de la línea celular y al Dr. OT Ramírez por las facilidades otorgadas para realizar los análisis de N-glicosilación.

Bibliografía.

1. Walsh, G. (2018). *Nat. Biotech*. 36:1136-1145.
2. Butler, M & Meneses-Acosta, A. (2012). Appl. Microbiol. Biotechnol. 96:885-894.
3. Mendoza-Pérez, J. et al. (2016). Biotechniques. 61:129-136.
4. Serrato, JA. *et al.* (2014). *Biotechnol. Bioeng*. 88:177-188.