
2. INTRODUCCIÓ.

2. INTRODUCCIÓ.

2.1. EL CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS.

2.1.1. Perspectiva històrica del cultiu *in vitro* de cèl·lules animals.

El cultiu de cèl·lules animals començà a desenvolupar-se a finals del segle XIX i ha donat els seus fruits al llarg del segle XX, amb tota una sèrie de fites que es descriuran de forma breu, però que són molt importants per entendre el desenvolupament d'aquesta disciplina i la seva aplicació industrial.

Al 1878 C. Bernard demostrà que el sistema fisiològic d'un organisme podia ser mantingut com un sistema viu després de la mort de l'organisme. Al 1885 W. Roux va concloure que el procés de creixement específic, observat en el manteniment d'una porció d'embrió de pollastre en solució fisiològica calenta, ocorre independentment de les altres parts de l'embrió. La prolífica recerca d'en R. Harrison (1907), considerat per alguns autors com el pare del cultiu cel·lular, el va portar a fets tan interessants com els que se citen a continuació: va mantenir durant algunes setmanes fragments neurals de la cresta d'embrions de granota; va observar el creixement de fibres nervioses *in vitro*; va utilitzar una gota de limfa coagulada de granota com a medi per al creixement cel·lular; va escollir granotes com a font de teixit, ja que és un animal de sang freda i així la incubació no era necessària. Al 1910, Burrows va ser el primer investigador en demostrar dos fets importants: cultivar amb èxit cèl·lules embrionàries de pollastre en coàguls de plasma durant llarg temps i l'observació detallada de la mitosi cel·lular. Durant el 1911, Lewis i Lewis observaren el creixement limitat en monocapes amb el primer medi líquid, que consistia en aigua de mar, sèrum, extracte embrionari, peptones i sals. Al 1916, Rous i Jones varen utilitzar per primera vegada l'enzim proteolític tripsina per resuspendre en cultiu cèl·lules adherents. Entre 1923 i 1931, Carrel i Baker varen enfocar la seva recerca al desenvolupament de tècniques d'escalat per a cultius cel·lulars i de recipients de cultiu: els *T-Flasks*. També realitzaren l'avaluació microscòpica de cèl·lules en cultiu. Al 1927, Carrel i Rivera produeixen la primera vacuna viral: Vaccinia. Uns anys més tard, al 1933, Gey desenvolupà la tècnica de cultiu en tubs rotatoris.

El medi químicament definit CMRL 1066, encara utilitzat en els estudis de virologia i citologia, va ser desenvolupat per Fischer al 1948. Al 1949, es va fer créixer el virus de la poliomièlitis tant en teixits humans com de simi per tal de produir-ne la vacuna a nivell industrial. Les cèl·lules carcinògenes HeLa (deuen el seu nom a la donant Henrietta Lacks) varen ser aïllades i propagades per Gey i col. al 1952. En aquest mateix any, Dulbecco

desenvolupà una placa d'assaig per virus animals mitjançant monocapes confluents de cèl·lules cultivades. Al 1954, Abercrombie observà inhibició per contacte: la mobilitat de cèl·lules diploides en cultius en monocapes s'aturava quan el contacte s'efectuava amb cèl·lules adjacents. En el decurs de 1961, Hatflick i Moorhead demostraren que els fibroblasts humans morien després d'un nombre finit de divisions. Al 1965, es realitzà la primera descripció d'un medi sense sèrum animal per Ham. Al 1975, Köhler i Milstein aconseguiren desenvolupar amb èxit una línia cel·lular d'hibridoma per a la producció d'anticossos monoclonals, mitjançant la fusió cel·lular d'un mieloma i un limfòcit de tipus B. Amb aquests descobriments la importància dels productes obtinguts a partir de cèl·lules animals va créixer espectacularment donat el seu potencial per a l'obtenció d'un ampli espectre de productes útils en el diagnòstic i tractament de malalties. A la Taula 2.1 es troben alguns dels productes i aplicacions de les cèl·lules animals.

<ul style="list-style-type: none">✓ Vacunes víriques humanes (poliomielitis i rubèola) i veterinàries (malalties de Marek i Newcastle).✓ Immunoreguladors diferents d'anticossos (interferons i interleucines).✓ Anticossos monoclonals per a diagnòstic, teràpia i tècniques de separació.✓ Factors de creixement polipeptídics (factor de creixement de l'epidermis i semblants a la insulina).✓ Enzims (activadors del plasminogen).✓ Hormones (eritropoietina).✓ Insecticides virals.✓ Antígens específics contra tumors.✓ Cèl·lules animals com a productes per a recerca bàsica, enginyeria genètica i tests de toxicitat.✓ Reconstitució de la pell.

Taula 2.1. Productes obtinguts a partir de cèl·lules animals. Alguns exemples i aplicacions.

Durant tota la dècada dels 70 la recerca s'enfocà cap al desenvolupament de tècniques i protocols experimentals com: els cultius en suspensió, la immobilització i l'encapsulació cel·lular, definició de medis sense sèrum i l'ús d'antibiòtics en aquests, així com el disseny de bioreactors, com ara els *air-lifts* i els de fibres buides (*hollow-fibers*) per cultivar cèl·lules animals a altes densitats, millorant-se molts aspectes, com ara l'agitació i l'aeració en condicions de mínim estrès cel·lular. A la dècada dels anys vuitanta es produeix un canvi enormement significatiu en el món de la Biotecnologia. L'aparició de les tècniques del DNA recombinant va permetre la introducció de gens que codificaven proteïnes animals d'interès en el material genètic de qualsevol microorganisme, per tal d'expressar-los i obtenir quantitats importants de la proteïna desitjada. D'aquesta manera és possible transferir rutinàriament gens humans a organismes unicel·lulars com bacteris o llevats. Alguns exemples de proteïnes humanes d'ús terapèutic obtingudes per tècniques de DNA recombinant són: la insulina, la

somatotropina o hormona del creixement, els antígens virals i els interferons. Aquestes proteïnes s'han expressat, bàsicament, en el bacteri *Escherichia coli* (Werner, 1993).

En els anys 80 i 90, el desenvolupament de sistemes de cultius per millorar el seu rendiment, el creixent èmfasi en la producció d'anticossos monoclonals o el desenvolupament d'alguns productes de cultiu cel·lular a partir de tècniques del DNA recombinant, han permès el creixement d'aquest camp. Productes com el t-PA (activador del plasminogen de teixits), hormones del creixement humana, interferons, factor VIII (hemofília), i EPO (eritropoietina) són només alguns dels exemples que es poden citar, ja desenvolupats i explotats a nivell comercial amb molt d'èxit. La perspectiva actual és que aquesta llista de productes anirà augmentant de forma exponencial i es produirà una consolidació notable d'aquesta tecnologia, com es pot desprendre de la gran quantitat de nous productes candidats desenvolupats per cultiu cel·lular que es troben en etapes avançades de desenvolupament, en fase clínica (PhRMA, 2000).

2.1.2. Interès i aplicacions del cultiu *in vitro* de cèl·lules animals.

Moltes biomolècules d'un elevat valor terapèutic són produïdes exclusivament per cèl·lules animals i, com s'ha comentat anteriorment, les aplicacions són cada vegada més nombroses. De tota forma, el cultiu industrial de la majoria de microorganismes és més simple que el de les cèl·lules animals i, per tant, la seva utilització es troba afavorida per una sèrie de raons:

- Productivitats cel·lulars més elevades.
- Control de contaminacions més fàcil.
- Medis de cultiu amb menys requeriments.
- L'emmagatzematge i resuspensió de les cèl·lules és més fàcil.

Tot i que la utilització de bacteris i llevats recombinants suposa un sistema d'obtenció de proteïnes d'origen animal molt atractiu degut als avantatges ja exposats abans, també presenta certes limitacions que fan inviable la producció de determinades proteïnes (Hu i Dodge, 1985). La incapacitat dels bacteris per produir glicosilacions i altres modificacions post-traduccionals, o per induir una configuració tridimensional correcta a la proteïna, poden repercutir en l'obtenció d'un producte final de baixa solubilitat, menor resistència a proteases i escassa activitat funcional (Berman i Lasky, 1985). També cal considerar que en molts casos les proteïnes estan constituïdes per múltiples subunitats que poden ser codificades per diferents gens, alguns dels quals possiblement no hagin estat introduïts en el bacteri. Un altre aspecte a tenir en compte són les diferències existents entre els processos transcripcionals dels organismes eucariotes i els procariotes, que poden impedir la correcta expressió de la

proteïna. Fins i tot, en el cas que la proteïna s'hagi expressat correctament, és possible que el bacteri no tingui capacitat per secretar-la extracel·lularment, dificultant així el procés de recuperació del producte.

Una altra alternativa pot ser la utilització d'un sistema d'expressió basat en fongs unicel·lulars (llevats). Aquests microorganismes poden créixer igual de bé i ràpid que els bacteris i, a més a més, tenen la capacitat de glicosilar, fosforilar, acilar i secretar les proteïnes produïdes, tot i que utilitzen uns patrons de modificació post-traduccional i unió macromolecular sovint diferents als de les cèl·lules de mamífer (Bebbington i Hentschel, 1985).

A més a més, cal tenir en compte que la legislació és molt estricta a l'hora de validar aquells productes d'ús terapèutic obtinguts a partir de bacteris i llevats recombinants, ja que aquestes proteïnes poden portar associats components de l'hoste o haver patit lleugeres modificacions respecte la seva conformació nativa, motiu pel qual podrien originar alguna resposta immunitària perjudicial. Així doncs, la utilització de cultius de cèl·lules animals és, en molts casos, l'opció més apropiada a l'hora d'obtenir un ampli ventall de proteïnes d'un elevat interès. Per aquest motiu, s'ha portat a terme un considerable esforç per tal de desenvolupar processos basats en el cultiu *in vitro* d'aquest tipus de cèl·lules, que permetin millorar-ne la productivitat i fer atractiva la seva explotació des del punt de vista comercial (Werner, 1998).

2.1.3. Trets distintius de la cèl·lula animal.

Les cèl·lules animals són cèl·lules eucariotes que presenten importants diferències morfològiques i funcionals respecte les cèl·lules procariotes i altres eucariotes com fongs unicel·lulars, fongs filamentosos i cèl·lules vegetals. Aquestes diferències poden provenir de la grandària de la cèl·lula, la presència o absència de paret cel·lular, el sistema d'organització cel·lular, els orgànuls presents, l'estructuració del material genètic i el tipus de divisió cel·lular. Els trets fonamentals que permeten diferenciar les cèl·lules animals de les procariotes i altres eucariotes són bàsicament els següents (Figura 2.1):

- Les cèl·lules eucariotes animals, a l'igual que les vegetals, tenen una grandària que oscil·la entre els 5 i els 20 μm de diàmetre mitjà, i són molt més grans que altres eucariotes com els llevats (3-7 μm) i que els organismes procariotes (0.3-1 μm).
- Les cèl·lules eucariotes, a diferència de les procariotes, presenten gran quantitat de membranes internes que no es troben unides a la membrana plasmàtica i que separen regions específiques de la resta del citoplasma. Aquestes membranes defineixen un

conjunt d'estructures subcel·lulars anomenades orgànuls (nucli, mitocondri, reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi, etc.) que tenen una funció cel·lular específica.

- Les cèl·lules eucariotes tenen una quantitat major de DNA que les procariotes. En el cas dels bacteris, el DNA s'organitza en un únic cromosoma que no es troba separat del citoplasma per cap embolcall nuclear i, fins i tot, determinades espècies contenen també plasmidis (petites estructures circulars de DNA amb capacitat d'autoreplicació). El DNA de les cèl·lules eucariotes es troba associat a múltiples proteïnes i s'estructura en parelles de cromosomes continguts dins del nucli.
- Les cèl·lules animals, a diferència dels llevats, fong filamentosos, cèl·lules vegetals i procariotes, no disposen d'una paret cel·lular que els hi confereixi rigidesa, únicament es troben envoltades per una fina membrana plasmàtica que regula l'entrada dels nutrients necessaris pel creixement i la sortida de subproductes cel·lulars. Aquest fet, tal com s'explica en el proper apartat, condiciona la manera com cal portar a terme els cultius *in vitro* de cèl·lules animals, donat que fa la cèl·lula molt més susceptible a esforços mecànics.

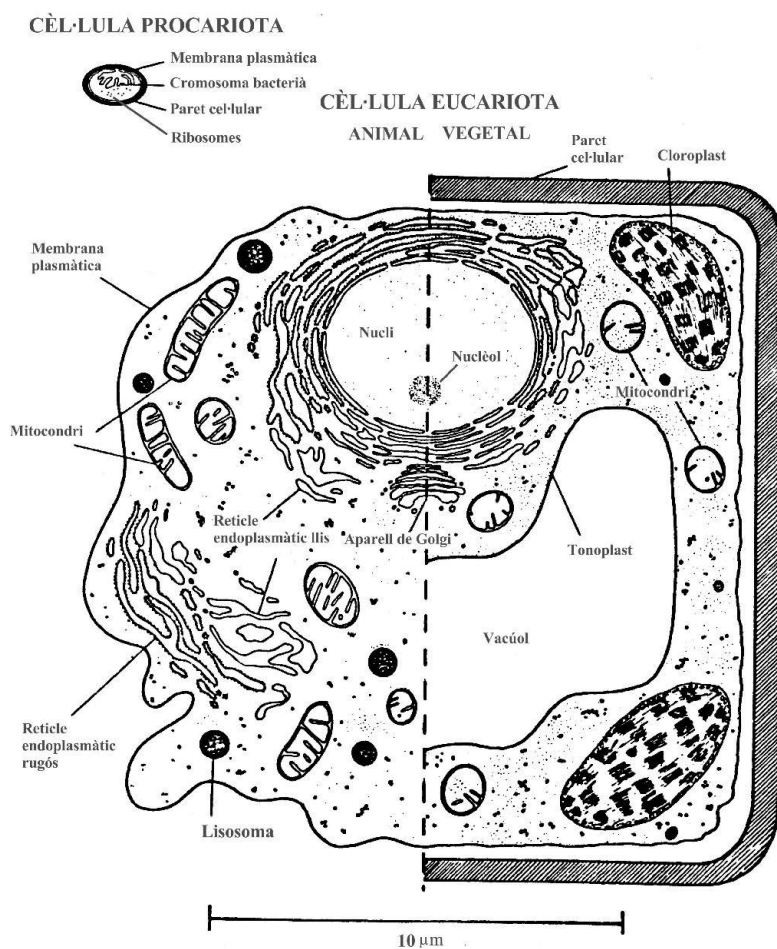


Figura 2.1. Esquema comparatiu entre cèl·lules eucariotes i procariotes.

2.1.4. Característiques dels cultius *in vitro* de cèl·lules animals.

El cultiu de cèl·lules animals requereix la utilització de medis complexes i molt rics en nutrients. Habitualment, aquests medis han estat formulats per operar només amb una estratègia de cultiu en discontinu, en què s'addiciona tots els nutrients a l'inici del cultiu i la durada d'aquest depèn del nutrient que s'esgota en primer lloc, o bé per la generació d'algun subproducte tòxic del metabolisme cel·lular. Aquests medis inclouen una font de carboni, normalment glucosa, una mescla equilibrada de sals minerals que permeten mantenir un pH i una pressió osmòtica adients, i un gran nombre d'aminoàcids i vitamines que la cèl·lula no està capacitada per fabricar, com a mínim en quantitats suficients (Freshney, 1989), entre els que la glutamina es troba en quantitats més importants, donat que també representa un subministrament de nitrogen i carboni. A més a més, usualment cal suplementar el medi amb un 1-20% (v/v) de sèrum animal, normalment sèrum fetal boví (FCS). Aquest producte proporciona una sèrie d'elements traça, lípids, factors de creixement i hormones que són imprescindibles per garantir el creixement de molts tipus de cèl·lules animals (Freshney, 1989). D'altra banda, el sèrum també pot contenir una sèrie de compostos que poden no tenir cap efecte positiu, o que, fins i tot, poden arribar a inhibir el creixement de les cèl·lules. Per aquest motiu és necessari provar que cada lot diferent de sèrum emprat permet el correcte creixement del cultiu (Freshney, 1989). Aquesta manera d'operar possiblement no és la més òptima ja que s'allunya molt de les condicions en què la cèl·lula animal es troba *in vivo*. Cal fer esment que darrerament s'ha fet un esforç notable en dissenyar medis de cultiu molt més definits, en què no calgui afegir sèrum animal. Habitualment, es diferencia entre medis sense proteïnes i sense sèrum, però amb proteïnes. Això és a causa de que moltes línies cel·lulars no poden proliferar en absència total de proteïnes. En aquests cal afegir, normalment, insulina i transferrina. També hi ha casos en què les cèl·lules requereixen petits percentatges de medi amb sèrum (inferior al 1%), per poder créixer correctament. L'efecte d'evolucionar a medis cada vegada més definits és molt desitjable per facilitar la validació dels processos de fabricació.

A més, és necessari realitzar un estricte control de diferents paràmetres fisicoquímics del cultiu (Freshney, 1994). Alguns d'ells romanen sempre constants al llarg de tot el procés: temperatura i agitació, mentre que d'altres poden veure's afectats per l'activitat cel·lular: pH, osmolaritat, pressió parcial d'oxigen dissolt.

La temperatura òptima per la majoria de cèl·lules animals oscil·la entre els 35 °C i els 37 °C, tot i que poden tolerar baixades considerables de temperatura, sobreviure durant varis dies a 4 °C i conservar-se en estat de latència en nitrogen líquid a -196 °C i presència de crioprotectors. Per contra, un augment de la temperatura per sobre dels 39 °C provoca una ràpida mort cel·lular. El rang de pH òptim per a les cèl·lules animals varia entre les diferents

línies cel·lulars, però es pot situar entre 7.0 i 7.4, uns valors molt propers als existents a la sang. Durant els cultius en discontinu, es dona un allunyament d'aquests valors òptims per la generació d'àcids orgànics degut a l'activitat metabòlica de les cèl·lules, i aquest fet sol originar una davallada del creixement cel·lular. Les cèl·lules comencen a perdre la viabilitat si el pH del medi s'allunya d'un rang de valors entre 6.6 i 7.8 unitats.

La majoria de cèl·lules animals accepten un ampli interval de pressions osmòtiques que van dels 260 als 320 mOsm/kg. De totes maneres, cal situar els valors òptims d'osmolaritat del medi als existents en el plasma sanguini de la majoria de mamífers, entre els 290 i 310 mOsm/kg. En certs processos on hi ha una addició continuada de nutrients concentrats es pot arribar a sobrepassar aquest rang, provocant també una inhibició del creixement cel·lular.

La naturalesa aeròbia del metabolisme de les cèl·lules animals motiva la necessitat de tenir una aeració del medi per tal d'assolir uns valors d'oxigen dissolt entre el 20 i el 60% dels nivells de saturació. Per tal d'aconseguir una difusió homogènia d'aquest gas en elevats volums de cultiu no és possible emprar sistemes d'agitació convencionals a alta velocitat o aeració per bombolleig ja que les cèl·lules animals no tenen paret cel·lular i són enormement sensibles als esforços tallants que originen aquests mecanismes d'agitació o als produïts al voltant de les bombolles d'aire, especialment quan es trenquen a la interfase aire-líquid del cultiu (Dodge i Hu, 1986; Tramper i col., 1986; Chalmers, 1994). Per aquest motiu, les cèl·lules animals es cultiven a velocitats d'agitació baixes (40-100 rpm) amb agitador de pales inclinades o hèlixs marines, i amb sistemes d'aeració sense bombolleig, com és el cas de la utilització d'un tub de silicona permeable als gasos que es submergeix en el medi de cultiu. L'addició de certs productes protectors al medi de cultiu que permeten treballar a unes condicions de major agitació i aeració poden resultar molt adequats a l'hora de minimitzar aquest tipus de limitacions.

Les cèl·lules animals tenen una velocitat de creixement inferior a la dels llevats, fongs o bacteris. El seu metabolisme més lent origina una major inèrcia de resposta als canvis de l'entorn i un temps de duplicació en la fase exponencial que acostumen a oscil·lar entre les 18 i les 36 hores (Freshney, 1989).

L'elevada riquesa del medi, les òptimes condicions de cultiu, la baixa velocitat de creixement i la lenta resposta metabòlica de les cèl·lules animals fan que aquest tipus de cultius siguin molt susceptibles a patir contaminacions per microorganismes o infeccions víriques. Per aquest motiu, cal adoptar una sèrie de mesures de seguretat addicionals per tal de garantir una total esterilitat en les condicions de treball.

Les tècniques de cultiu cel·lular intenten proporcionar a la cèl·lula unes condicions que permetin el seu desenvolupament, tot i que sovint aquestes no reproduïxen l'entorn en què la cèl·lula es desenvolupa habitualment, és a dir, en el si dels organismes pluricel·lulars. Per tant, en l'optimització dels cultius *in vitro* s'ha de tendir cap a un acostament als factors que simulin millor aquestes condicions naturals de la cèl·lula.

2.1.5. Cèl·lules animals i línies cel·lulars emprades en cultius *in vitro*.

Les cèl·lules animals que s'utilitzen en cultius *in vitro* fonamentalment provenen de quatre tipus bàsics de teixits de mamífer: epitelial, muscular, nerviós i connectiu (Shahar i col., 1994). També s'utilitzen cèl·lules que provenen d'altres vertebrats o, fins i tot, d'invertebrats, com és el cas de les cèl·lules d'insecte (Martignoni, 1984). Totes aquestes cèl·lules es poden agrupar en dos grans grups d'acord amb els requeriments de cultiu que precisen:

- **Cèl·lules adherents:** Són aquelles que únicament creixen si es troben adherides a un suport sòlid. No arriben mai a assolir elevades densitats cel·lulars ja que deixen de créixer un cop han format una monocapa de cèl·lules sobre la superfície a la qual es troben adherides. Acostumen a ser cèl·lules musculars, nervioses, epitelials que s'obtenen d'òrgans com el ronyó, el fetge o els fibroblasts.
- **Cèl·lules no adherents:** Poden créixer en suspensió en el medi, per aquest motiu arriben a assolir densitats cel·lulars superiors a les adherents. En aquest grup es troben les cèl·lules del sistema immunitari presents a la medul·la òssia o la sang, les cèl·lules tumorals malignes i, en conseqüència, també els hibridomes.

S'anomenen línies cel·lulars aquell tipus de cèl·lules que han estat transformades per tal d'adquirir la capacitat de poder ser cultivades indefinidament (Werner i Noé, 1993). El procés de creació d'una línia cel·lular s'inicia a partir d'una suspensió de cèl·lules d'un teixit animal que es cultiva en medi líquid per tal de formar un cultiu primari. Posteriorment, part de les cèl·lules que han crescut en el cultiu primari es subcultiven en medi fresc per tal d'obtenir un cultiu secundari. Aquest cultiu secundari es pot subcultivar al llarg d'un nombre finit de generacions, fins que les cèl·lules perden la capacitat de dividir-se i entren en una fase de senescència. En determinades circumstàncies alguna de les cèl·lules del cultiu secundari pateix una mutació espontània que li permet seguir creixent. El cultiu que s'obté a partir d'aquesta cèl·lula esdevé una línia cel·lular. Aquesta mutació cel·lular també es pot induir a través de virus, substàncies químiques o radiacions.

Les línies cel·lulars, a més de tenir la capacitat de poder ser cultivades indefinidament, presenten també altres característiques com són un creixement més ràpid i la possibilitat de ser cultivades en suspensió, de manera que es pugui assolir majors densitats cel·lulars. Per aquest motiu representen un sistema d'expressió molt atractiu per proteïnes recombinants d'origen animal. Un exemple d'aquestes línies cel·lulars són els híbridomes murins, les cèl·lules CHO (*Chinese Hamster Ovary*), BHK (*Baby Hamster Kidney*) o HeLa (cèl·lules extretes d'un tumor del coll de l'úter d'Henrietta Lacks).

2.1.6. Evolució d'un cultiu cel·lular.

El creixement d'un cultiu de cèl·lules animals *in vitro* en discontinu segueix un patró com el que es veu a la Figura 2.2, que s'agafa sempre com a referència. L'inòcul inicial de cèl·lules requereix un període d'adaptació al medi fresc, que es fa aparent com un període de latència (Fase I), la durada del qual dependrà de l'estat previ de les cèl·lules. El subcultiu de cèl·lules creixent en un medi fresc a la meitat de la fase exponencial amb una concentració de l'ordre de 10^5 cèl·lules/ml no requereix adaptació i no hi ha pràcticament fase de latència, tot i que cal assenyalar que moltes vegades s'observen diferències en la fase d'arrancada dels cultius degut a variacions, a vegades petites, en l'estat de l'inòcul.

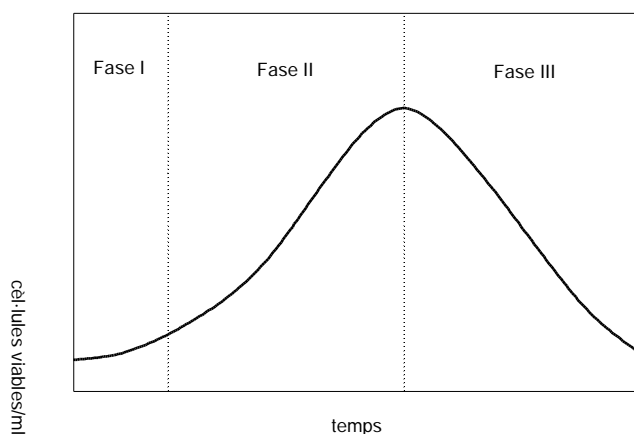


Figura 2.2. Corba de creixement i mort d'un cultiu cel·lular.

A continuació, segueix la fase exponencial amb un temps de duplicació típic de 18-24 hores (Fase II). Cal tenir en compte que el temps de duplicació dels bacteris i llevats pot ser tan baix com de 20-30 minuts. És molt important, doncs, prendre les mesures necessàries per mantenir l'esterilitat dels cultius de cèl·lules animals ja que, tractant-se de medis tan rics, la contaminació microbiana pot sobrepassar la població de cèl·lules animals ràpidament. Les cèl·lules animals, a banda de tenir velocitats de creixement inferiors que els microorganismes, arriben a concentracions cel·lulars inferiors, essent de l'ordre de 10^6 cèl·lules/ml, en

comparació amb els valors de 10^8 - 10^9 cèl·lules/ml que s'assoleixen en els cultius de bacteris i llevats.

El creixement cel·lular segueix fins un punt en què la viabilitat comença a disminuir i les cèl·lules entren a la fase de mort (Fase III). Aquest fet coincideix amb l'esgotament d'algun dels nutrients essencials del medi de cultiu, normalment glucosa o glutamina (Fitzpatrick i col., 1993; Sanfeliu, 1995), o amb l'acumulació de concentracions tòxiques de subproductes cel·lulars com el lactat o l'amoni (Ozturk i col., 1992). El procés de mort cel·lular es pot produir per necrosi o per apoptosi (Martin i col., 1994; Ameisen, 1998). La necrosi és un procés passiu de mort cel·lular que es dona quan les cèl·lules es troben exposades a condicions fisicoquímiques del cultiu desfavorables: hipertèrmia, canvis sobtats de pH, velocitats d'agitació excessivament altes o exposició a substàncies tòxiques, que impedeixen que la cèl·lula pugui mantenir l'homeòstasi i acabi per patir un trencament de la membrana plasmàtica i un alliberament al medi de tot el contingut citoplasmàtic. Per contra, l'apoptosi o mort cel·lular programada és un procés controlat genèticament per la pròpia cèl·lula, que té lloc sota condicions fisiològiques normals i en resposta a una sèrie d'estímuls molt concrets. L'apoptosi pot ser un mecanisme important de la mort cel·lular en cultius *in vitro* (Singh i col., 1994; Cotter i Al-Rubeai, 1995). En particular, s'ha vist que els híbridomes i les línies cel·lulars hematopoiètiques són altament sensibles a la inducció de l'apoptosi en un cultiu en discontinu, molt probablement com a resultat de limitacions per nutrients essencials o acumulació de subproductes cel·lulars (Mercille i col., 1994). Un aspecte molt important que cal tenir en compte és que aquest és un procés irreversible, i una vegada un cultiu hagi iniciat el procés d'apoptosi no es podrà recuperar malgrat que es faci una acció per eliminar la causa que ha provocat el procés.

2.2. HIBRIDOMES I ANTICOSSOS MONOCLONALS.

Els anticossos, també anomenats immunoglobulines (Ig), són un grup de glicoproteïnes presents en el sèrum, fluids intersticials i sobretot a la sang dels vertebrats, que són sintetitzades i secretades pels limfòcits B en resposta a un element estrany a l'organisme anomenat antigen. Cada tipus d'anticòs reconeix i s'uneix a un antigen específic i el complex que es forma desencadena certes reaccions corporals que neutralitzen i eliminen aquests elements estranys. Així doncs, els anticossos són els responsables de la protecció específica enfront infeccions bacterianes, fúngiques i víriques, i estan involucrats en una sèrie de reaccions immunològiques que inclouen la inflamació, l'autoimmunitat i el rebuig a trasplantaments (Milstein, 1980).

Quan s'injecta un antigen a un animal i, posteriorment, es recull el sèrum d'aquest, s'obté una barreja heterogènia d'anticossos anomenats policlonals. Cadascun d'aquests anticossos reconeix parts distintes de l'antigen (epítops), ja que han estat sintetitzats per limfòcits B diferents.

Per tal de resoldre el problema de la heterogeneïtat dels antisèrums amb anticossos policlonals, l'any 1975 Köhler i Milstein varen desenvolupar una tècnica per produir una línia cel·lular denominada hibridoma que sintetitzava anticossos amb una especificitat idèntica, anomenats anticossos monoclonals. Els hibridomes són cèl·lules animals resultants de la fusió d'un limfòcit B normal amb una cèl·lula de mieloma o limfòcit B cancerós, de manera que la cèl·lula resultant hereta tant les propietats del limfòcit B per produir anticossos específics com el caràcter immortal de les cèl·lules de mieloma. Com que cada línia d'hibridomes prové d'un únic limfòcit B originari, en cada cultiu d'hibridomes només es produirà un únic tipus d'anticòs, un anticòs monoclonal.

2.2.1. Obtenció d'hibridomes.

El procediment emprat generalment per a l'obtenció d'hibridomes consisteix en una immunització inicial d'un animal amb l'antigen desitjat per tal de provocar en aquest una resposta immunitària secundària. Posteriorment s'extreu la melsa de l'animal per tal de separar-ne els limfòcits B. La suspensió de limfòcits B obtinguda es posa en contacte amb un cultiu de cèl·lules de mieloma en presència d'un agent promotor de la fusió cel·lular. Les cèl·lules resultants d'aquesta fusió s'anomenen hibridomes.

El mieloma és un càncer que afecta els limfòcits B presents a la medul·la òssia; aquestes cèl·lules tumorals tenen la capacitat de multiplicar-se indefinidament al ser cultivades *in vitro*, produint grans quantitats d'un únic tipus d'immunoglobulina. Actualment, es disposa de línies de mieloma mutants que no secreten cap immunoglobulina (NS0), o bé que únicament en fabriquen la cadena lleugera (NS1), de manera que l'hibridoma resultant només produirà la immunoglobulina codificada pel limfòcit B no tumoral (Köhler i Milstein, 1975).

Un cop realitzada la fusió cel·lular es cultiva aquesta barreja heterogènia de cèl·lules en un medi selectiu on només sobreviuen i creixen els híbrids limfòcit-mieloma. Aquests hibridomes tenen inicialment 80 cromosomes, aquest fet provoca una enorme inestabilitat genòmica, de manera que les cèl·lules van perdent cromosomes durant els primers dies de cultiu. En aquest punt del procés es realitza una selecció clonal per tal d'identificar híbrids productors de l'anticòs desitjat i obtenir-ne poblacions homogènies procedents únicament de cadascuna d'aquestes cèl·lules. Finalment, es comprova l'estabilitat de l'hibridoma i es

congela cadascun dels clons purs obtinguts. A la Figura 2.3 s'il·lustra el procés emprat per l'obtenció d'hibridomes productors d'anticossos monoclonals.

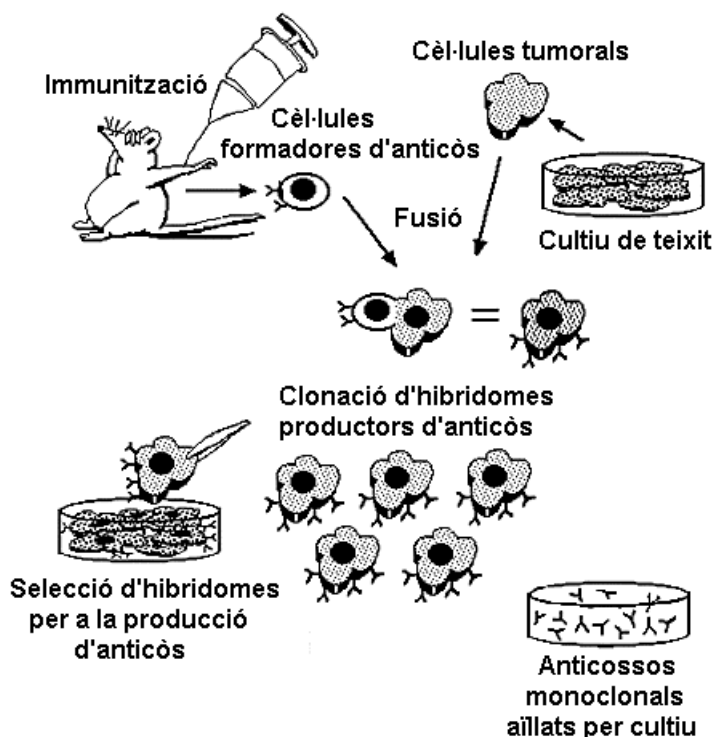


Figura 2.3. Esquema del procés d'obtenció d'hibridomes productors d'anticossos monoclonals.

2.2.2. Estructura dels anticossos monoclonals.

Les immunoglobulines (Figura 2.4) estan constituïdes per 4 cadenes polipeptídiques: dues de pesades (H) idèntiques, unides entre si per ponts disulfur, i dues de lleugeres (L), també idèntiques, que s'uneixen a les pesades també per ponts disulfur. Tenen una estructura quaternària en forma d'Y, amb dues regions idèntiques d'unió a l'antigen. Tant les cadenes L com les cadenes H tenen una seqüència a l'extrem amino terminal específica per a cada classe d'immunoglobulina (anomenada regió variable), i una seqüència constant a l'extrem carboxi terminal (anomenada regió constant). La regió variable permet el reconeixement i la unió específica de cada immunoglobulina amb el seu corresponent antígen, mentre que la regió constant permet la funció efectora de la molècula: unió i activació del complement, estimulació de la fagocitosi per macròfags. La presència d'un patró determinat de glicosilació en la immunoglobulina és essencial a l'hora de portar a terme algunes d'aquestes funcions efectores.

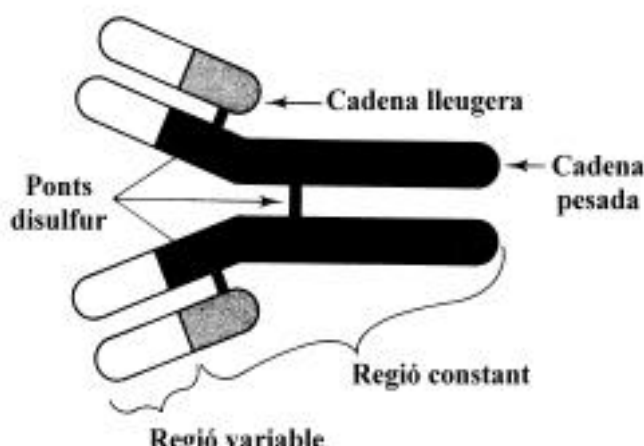


Figura 2.4. Esquema d'una immunoglobulina (Kirkwood i Lewis, 1985).

2.2.3. Producció d'anticossos monoclonals mitjançant híbridomes.

Gràcies a la seva gran especificitat per reconèixer una part d'una determinada molècula, els anticossos monoclonals són una eina de gran utilitat en diferents camps de la recerca mèdica i biològica, així com en el desenvolupament de productes per diagnosi i teràpia de malalties, i com a elements importants en sistemes de purificació. Les seves aplicacions s'adrecen bàsicament a la diagnosi i tractament terapèutic de malalties infeccioses o processos tumorals (Milstein, 1980; Fridman, 1991; Werner i Noé, 1993), a la implementació de processos de purificació de macromolècules específiques per cromatografia d'afinitat, i a la recerca bàsica en el camp del disseny de vacunes o de la detecció i l'estudi de les funcions biològiques de determinades proteïnes (Clark, 1986).

És possible produir anticossos monoclonals a partir d'híbridomes mitjançant tècniques *in vivo* i *in vitro* (Shintani i col., 1988). La tècnica d'obtenció d'anticossos monoclonals en processos *in vivo* consisteix en injectar híbridomes en la cavitat intraperitoneal d'una rata o ratolí, propiciant que aquests es multipliquin i donin lloc a tumors ascítics de volum considerable. Aquests processos permeten únicament l'obtenció de poca quantitat d'anticòs monoclonal, ja que encara que la seva concentració pugui ser alta en el líquid ascític, els rendiments que s'obtenen de cada animal són baixos degut al costós procés de purificació que cal emprar per separar els anticossos monoclonals de la resta de proteïnes de l'animal, immunoglobulines incloses. A més a més, les possibilitats de manipular les condicions externes per tal d'aconseguir més anticossos monoclonals són molt limitades. Així doncs, aquest mètode resulta poc recomanable a l'hora de produir anticossos monoclonals a gran escala, ja que resulta molt car, poc eficient i presenta també problemes ètics i de regulació, ja que la utilització d'animals amb fins de producció està limitada per la llei.

Les exigències de quantitat i qualitat que ha generat l'aplicació d'anticossos monoclonals, en el mercat científic i mèdic actual, ha impulsat el desenvolupament de mètodes alternatius de producció basats en cultius d'hibridomes *in vitro* a gran escala. Els hibridomes poden créixer en cultius en suspensió, i per tant es poden cultivar en bioreactors industrials semblants als que s'utilitzen pel cultiu de bacteris o llevats, incorporant, però, les especificitats d'aquestes cèl·lules ja discutides anteriorment. Normalment, les concentracions d'anticossos monoclonals que s'obtenen en aquests cultius són més baixes que les produïdes *in vivo*, no obstant, el sobrenedant obtingut presenta un únic tipus d'anticòs monoclonal, de manera que la purificació resulta molt menys costosa. A més a més, la possibilitat d'optimitzar determinats paràmetres del cultiu permet millorar el rendiment fins al punt en què la producció de l'anticòs monoclonal arriba a ser viable a nivell industrial (Zhou i col., 1997).

2.3. OPTIMITZACIÓ DELS CULTIUS *IN VITRO* DE CÈL·LULES ANIMALS.

Tal com s'ha pogut veure en apartats anteriors, el cultiu *in vitro* de cèl·lules animals suposa sovint la manera més apropiada de produir grans quantitats d'un ampli ventall de proteïnes d'elevat interès en els camps de la diagnòsi mèdica i la terapèutica. De totes maneres, cal tenir en compte que els requeriments d'un cultiu de cèl·lules animals com els hibridomes són molt més complexes que els necessaris per cultivar microorganismes, i que, a més a més, les seves productivitats són normalment més baixes. Per aquest motiu sorgeix la necessitat d'optimitzar una sèrie d'aspectes relacionats amb el cultiu *in vitro* d'aquestes cèl·lules per tal d'augmentar el seu rendiment i fer-los viables econòmicament.

2.3.1. Definició del medi de cultiu.

Els medis de cultiu utilitzats per les cèl·lules animals són cars i complexes. Com ja s'ha comentat a l'apartat 2.1.4, un dels aspectes fonamentals a tenir en compte a l'hora d'intentar cultivar cèl·lules animals és el medi de cultiu emprat. És de vital importància que aquest s'adapti a l'estratègia de cultiu escollida. Així doncs, una correcta formulació del medi és un dels aspectes inicials en què cal començar a treballar a l'hora d'optimitzar el creixement del cultiu cel·lular i millorar la producció del producte d'interès. Per arribar a assolir aquesta optimització del medi de cultiu cal realitzar una sèrie d'estudis previs que permetin determinar quins són els principals nutrients que s'esgoten inicialment i limiten el creixement del cultiu, i quins d'aquests nutrients originen els subproductes cel·lulars que poden arribar a ser tòxics pel cultiu (Sanfeliu i col., 1997).

Un altre aspecte que ha rebut l'atenció de molts investigadors és obtenir una millor definició del medi al suplir el sèrum per compostos coneguts (Barnes i Sato, 1980; Glassy i col., 1988; Shinmoto i Dosako, 1993; Sanfeliu, 1995). Els inconvenients que presenta la utilització del sèrum s'han exposat anteriorment a l'apartat 2.1.4. Cal tenir en compte, però, que l'elaboració de medis sense sèrum és laboriosa, cal fer-la per a cada tipus cel·lular, i la fragilitat de les cèl·lules front l'estrès físic en un medi sense sèrum augmenta. Per tant, la reducció de sèrum en el medi de cultiu sense pèrdua de les condicions òptimes de cultiu serà una millora a considerar en la definició del procés.

2.3.2. Procés de purificació.

En general, el procés de cultiu cel·lular s'ha de dissenyar considerant el procés de purificació posterior i, idealment, s'hauria d'aconseguir una producció amb una concentració elevada de cèl·lules viables, i per tant de producte, en un medi químicament senzill que contingui el mínim de proteïnes i altres compostos que interfereixin en la purificació. Cal tenir en compte que en aquests processos, quan el producte es destina a l'ús terapèutic, l'elevat cost del procés de purificació, que ve condicionat normalment per aspectes de tipus regulador, que forcen a demostrar la puresa fins a límits extremadament rigorosos, domina moltes vegades l'economia global del procés industrial. Aquest fet fa que quan s'optimitza el procés de forma global, l'objectiu que es busca en l'etapa de cultiu és la màxima concentració final del producte, i no tant la productivitat, com és el cas en productes més bàsics i amb menor cost de purificació. No obstant, aquesta relació en la integració entre el procés de cultiu i el de purificació també pot venir dominada per altres factors, com ara l'estabilitat de la proteïna. En el cas de proteïnes poc estables, el factor que dicta l'operació és obtenir un temps de residència baix del producte al reactor, que minimitzi la pèrdua de qualitat, i un procés de purificació que permeti tractar de forma immediata el sobrenedant del cultiu.

2.3.3. Metabolisme i fisiologia cel·lular.

Cal tenir en compte que quan les cèl·lules es cultiven *in vitro* normalment es fa fora de context (estratègies de cultiu en discontinu i medis altament rics), el que provoca un comportament metabòlic alterat. És a dir, el cultiu cel·lular amb un medi normal, on substrats com la glucosa i la glutamina estan en concentracions elevades, provoca una desregulació en els fluxos d'entrada d'aquests substrats produint simultàniament una sèrie de subproductes tòxics per a les cèl·lules. Una forma d'abordar aquest problema és mitjançant l'optimització fisiologicometaabòlica. Això es pot aconseguir amb la modificació raonada dels fluxos metabòlics cel·lulars, o Enginyeria metabòlica, que representa una eina de treball força atractiva a l'hora de modificar els fluxos metabòlics, les vies d'entrada de nutrients a la cèl·lula, l'eficàcia dels processos d'obtenció d'energia, la producció de subproductes

inhibitoris del creixement o l'obtenció de proteïnes d'interès (Bailey, 1991; Fussenegger i Bailey, 1998; Paredes i col., 1999).

Les cèl·lules animals, i en particular els hibridomes, tenen un metabolisme i uns mecanismes de regulació complexes. El coneixement dels fluxos metabòlics dels principals compostos cel·lulars permet saber de quina manera la cèl·lula utilitza els diferents nutrients necessaris per al seu creixement. Aquestes dades poden ser utilitzades a l'hora d'optimitzar d'una manera racional el medi de cultiu, o bé poden donar indicacions sobre quins són els fluxos metabòlics importants que poden ser interessants modificar mitjançant tècniques de biologia molecular, per tal d'obtenir un comportament diferent de les cèl·lules.

Una altra possible via d'actuació és l'alteració d'alguna de les múltiples rutes cel·lulars a través de les quals s'executa el procés de mort cel·lular programada o apoptosi. Aquest és un procés molt complex en què es troben implicats un gran nombre de gens activadors i inhibidors (Bousquet i Shartou, 1995; Yuan, 1995). La utilització de tècniques de biologia molecular per tal de sobreexpressar alguns dels gens inhibidors o inhibir alguns dels gens activadors de l'apoptosi representa una opció prou vàlida a l'hora d'intentar inhibir o, si més no, retardar l'inici de l'etapa de mort cel·lular i aconseguir d'aquesta manera allargar la durada del cultiu (Dickson, 1998). És important doncs, l'estudi de la possible utilització de les cèl·lules animals modificades genèticament per amplificar l'expressió del producte d'interès, així com també, a través de la inhibició de l'apoptosi, perllongar la durada del cultiu. En qualsevol cas, és important considerar la combinació i integració de les estratègies a nivell de modificació genètica amb les corresponents al nivell de l'operació del cultiu.

2.3.4. Paràmetres fisicoquímics.

Un altre dels aspectes bàsics que cal tenir en compte a l'hora de cultivar *in vitro* hibridomes és la necessitat de mantenir els diferents paràmetres fisicoquímics del cultiu dintre dels rangs òptims de temperatura, pH, agitació i oxigen dissolt tolerats per la cèl·lula (Ozturk i Palsson, 1991a i 1991b). Així doncs, cal conèixer quin és el valor òptim de cadascun d'aquests paràmetres en la línia cel·lular cultivada, i disposar d'un sistema de cultiu en què tots aquests paràmetres estiguin controlats degudament.

2.3.5. Sistemes de cultiu.

L'estratègia de cultiu emprada és un altre factor clau a l'hora d'obtenir un millor rendiment del procés. El cultiu *in vitro* de cèl·lules animals es pot portar a terme mitjançant dos sistemes diferents:

- **Cultius homogenis:** Les cèl·lules creixen en suspensió. A la bibliografia es poden trobar exemples de producció amb cèl·lules lliures en cultius en discontinu, *fed-batch* i continu sense i amb retenció cel·lular (perfusió). Tot i que les principals característiques de cadascun d'aquests sistemes de cultiu s'expliquen amb més detall al capítol 6, a la Figura 2.5 es mostren esquemàticament alguns dels trets diferencials de cadascuna d'aquestes estratègies de cultiu per a cèl·lules animals. En cultius en suspensió s'assoleixen concentracions cel·lulars en el rang de 10^6 fins a 10^8 cèl·lules/ml dependent del tipus d'estratègia i de la cèl·lula utilitzada.

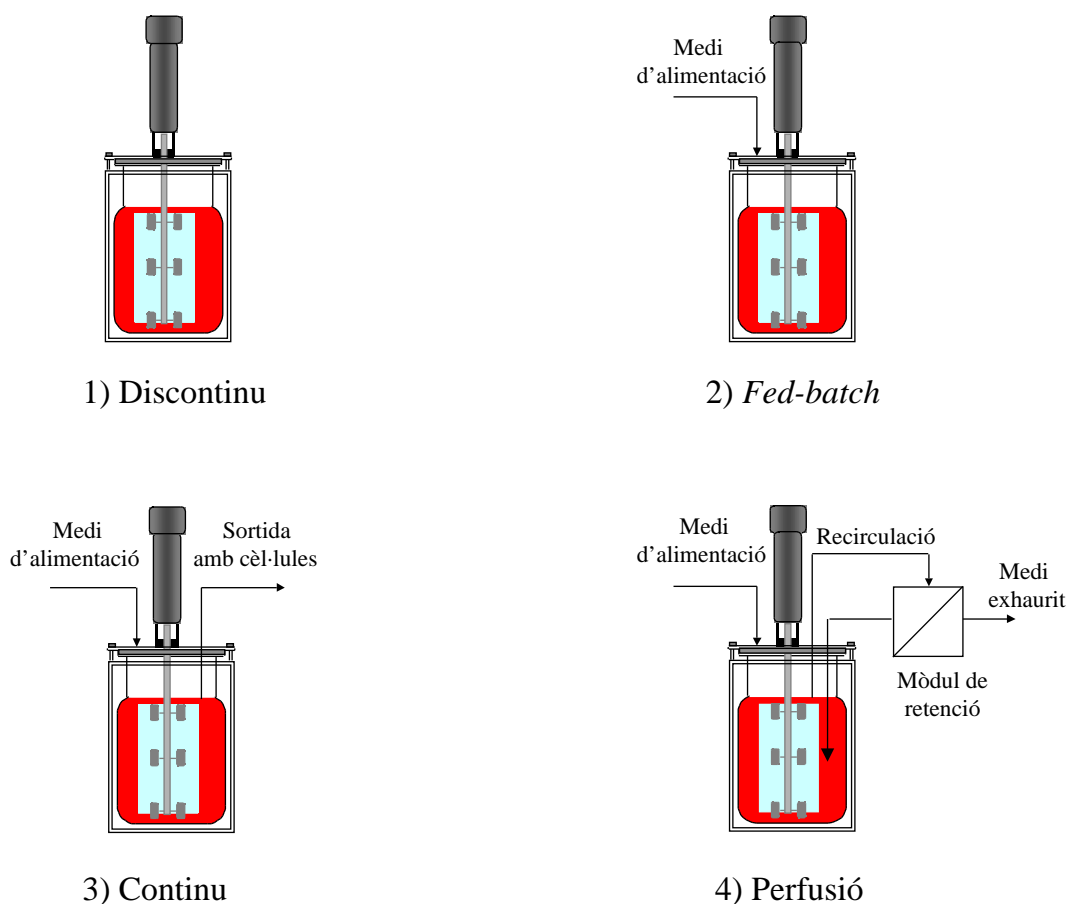


Figura 2.5. Diferents tipus d'operació amb reactors de tanc agitat per a cultius de cèl·lules animals. 1) Discontinuu. Tots els components s'addicionen abans del cultiu. 2) *Fed-batch* o discontinuu alimentat. S'addiciona un corrent d'aliment concentrat durant l'operació. 3) Continu. S'addiciona contínuament un corrent d'aliment i s'extreu un corrent de producte amb cèl·lules. 4) Perfusió. S'addiciona un corrent d'aliment i s'extreu un corrent de producte, implementant-se un sistema de retenció per a les cèl·lules extern o intern.

- **Cultius heterogenis:** Les cèl·lules es troben immobilitzades. A la majoria dels casos s'utilitzen cultius en continu que reben el nom de cultius en perfusió. En el cas de cèl·lules animals adherents és l'únic tipus possible de cultiu. La utilització de cèl·lules no adherents immobilitzades pot solucionar una sèrie de problemes com són la protecció de les cèl·lules de l'entorn físic i l'assoliment de densitats cel·lulars més altes. No obstant, també poden

presentar una sèrie de problemes, com ara limitacions per transferència de matèria i de disminució de la viabilitat cel·lular durant la immobilització. Un dels avantatges d'aquests sistemes és que per algunes aplicacions permeten reproduir l'estructura tridimensional dels teixits, que és important per la funcionalitat de les cèl·lules, per exemple en el desenvolupament d'òrgans artificials.

Així doncs, l'optimització del procés passa per definir i provar quina de les possibles estratègies de cultiu en reactor de tanc agitat permet obtenir concentracions finals de producte en el brou de cultiu més elevades i majors productivitats.

2.3.6. Monitoratge i control.

Un altre dels aspectes que pot ser important a l'hora d'optimitzar un cultiu *in vitro* de cèl·lules animals és la possibilitat de disposar de sistemes de monitoratge i control. Inicialment, es considerava que l'increment en la productivitat d'anticossos monoclonals podia aconseguir-se amb una bona selecció de la línia cel·lular d'hibridoma i la millora del medi (Fu i Barford, 1994), essent més recentment quan també s'han incorporat eines de monitoratge i control en aquesta optimització.

Com ja s'ha discutit prèviament, les limitacions imposades per les característiques de les cèl·lules animals han limitat l'assoliment de sistemes de cultiu amb elevades densitats cel·lulars, i tot i els esforços en el disseny de reactors, encara és habitual operar a baixes concentracions. Per tant, encara existeixen en aquests cultius possibilitats de millora per intensificar els processos.

El propòsit general en l'optimització és definir un conjunt de valors de les variables subjectes a vàries limitacions, que produiran la resposta òptima per a la funció objectiu escollida. Per al cultiu de cèl·lules, l'objectiu és manipular el procés a fi de perllongar la longevitat del cultiu i mantenir la síntesi i secreció d'anticossos, o el que és el mateix: obtenir el màxim possible de densitat cel·lular i mantenir la viabilitat cel·lular el màxim de temps possible. El procés de control i optimització industrial del cultiu d'hibridomes està endarrerit respecte els desenvolupaments d'altres processos industrials. Les raons d'això són nombroses. En primer lloc, cal assenyalar que alguns aspectes de com afecta el cultiu *in vitro* en bioreactors, la fisiologia i el metabolisme de les cèl·lules animals, i les alteracions de les condicions de cultiu encara no estan ben caracteritzats des del punt de vista bàsic. Una altra de les raons és la inexistència de models fiables per descriure els estats transitoris del sistema biològic, tot i que s'han realitzat avanços en la seva comprensió (Fu i Barford, 1994). A més a més, la implementació d'estratègies de control està obstaculitzada per l'escassetat de sensors en línia, fiables i robusts, de les variables més importants. Tot just comença a estar disponible

la instrumentació en línia dels paràmetres fisiològics claus que caracteritzen els processos de cultiu cel·lular. Aquesta situació propicia que a nivell industrial, l'operació moltes vegades es limiti a operar en sistemes en discontinu, suboptimitzats.

La disponibilitat de sistemes de mesura en línia que permetin conèixer en cada moment la concentració i la viabilitat cel·lular i la concentració dels compostos claus del cultiu, són una eina de treball essencial a l'hora de poder regular el nivell dels compostos en el medi de cultiu. A més, de forma genèrica també és interessant disposar de mesures en línia del producte i l'activitat de les cèl·lules. En les últimes dues dècades, molts treballs s'han dedicat a desenvolupar mètodes per obtenir informació en línia sobre el comportament cel·lular i poder aplicar un control d'addició dels nutrients. Per aconseguir aquest objectiu els diferents treballs publicats han seguit dues estratègies diferents: les aproximacions de control d'anell tancat i les de control d'anell obert. La primera utilitza diferents tipus de sensors o d'altres eines de tipus analític per determinar la concentració de la variable control en línia, i estima el volum o cabal d'addició en base a aquesta. Aquestes eines analítiques o sensors es basen en un ampli rang de tècniques, algunes de les quals es descriuen al capítol 4. Mentre que la segona es basa en utilitzar determinats models matemàtics (implementats dins d'un programa informàtic - *software sensor*) que a partir de la informació ja disponible estimen, en temps real, una o vàries variables del cultiu cel·lular que no són mesurables en línia i apliquen l'addició en base a trajectòries d'alimentació òptimes.

El problema de controlar i optimitzar el procés dels cultius cel·lulars no és senzill, ja que les variables són difícils de mesurar, la qualitat del producte juga un paper important, i lo normal és que els paràmetres estequiomètrics del cultiu variïn amb el temps. A més a més, les eines de control convencionals, com els controladors PID, no són apropiades per controlar un procés adequadament, degut a la gran complexitat i incertesa del sistema amb cèl·lules animals (Fu i Barford, 1994). Per superar aquest tipus de dificultats, alguns autors han utilitzat algorismes informàtics incorporant estratègies de control avançades, en què les variables de control més comuns han estat la concentració i el cabal de substrat (De Tremblay i col., 1993). Aquests algorismes s'han utilitzat per optimitzar la productivitat del procés de cultiu i el seu objectiu ha estat mantenir els nutrients del cultiu dins el rang desitjat. L'avantatge de combinar l'addició d'un o varis substrats també ha estat discutida (Glacken i col., 1986; De Tremblay i col., 1992), i també es troba a la bibliografia algun intent d'aplicació per monitorar i controlar el procés amb eines com la intel·ligència artificial (Konstantinov i col., 1994a) o com els *software sensors* (Pelletier i col., 1994).

La majoria de les estratègies de control es basen en la selecció d'un criteri d'addició per evitar possibles exhauriments de nutrients a nivells on aquests podrien ser limitants. Aquestes implementacions amb criteris d'addició es basen en l'ajust d'un cabal per a la

manipulació de l'entorn cel·lular. En aquest sentit, alguns treballs publicats han desenvolupat estratègies amb control de llaç tancat, els quals disposen d'una o vàries mesures en línia de les variables més rellevants del procés tant en cultius en *fed-batch* (Kurokawa i col., 1994; Zhou i col., 1995; Oh i col., 1996; Lenas i col., 1997) com en continus amb perfusió (Kyung i col., 1994; Konstantinov i col., 1996; Chuppa i col., 1997; Ozturk i col., 1997a; Jorjani i Ozturk, 1999). Així doncs, el desenvolupament d'eines de monitoratge i control ha de permetre un subministrament més òptim dels diferents nutrients, de manera que ajudi a mantenir durant més temps la viabilitat cel·lular, sense que aquesta es vegi afectada per la presència d'elevades concentracions de subproductes tòxics (Glacken i col., 1986).

En el present treball s'intenta maximitzar la concentració de cèl·lules viables, i de fet el producte d'interès, per a l'hibridoma KB-26.5, mitjançant l'aplicació de diferents estratègies de cultiu, basades en eines d'instrumentació i control, i informàtiques, totes elles desenvolupades i/o implementades al llarg d'aquest treball. Els aspectes relacionats amb el medi de cultiu i les solucions d'alimentació, així com la definició d'estratègies d'addició es valoren per a cada estratègia de cultiu. A més a més, són objecte d'estudi i discussió la resposta i el comportament de les cèl·lules d'hibridoma davant les diferents condicions i sistemes de cultiu provats durant aquest treball.