

LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES
LA CURIOSIDAD COMO FUENTE DE RIQUEZA

César Milstein

LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES
LA CURIOSIDAD COMO FUENTE DE RIQUEZA

*Conferencia dictada en el Aula Magna de la
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de
la UBA, el 15 de diciembre de 1999*



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Coordinador editorial: Armando Doria

Diseño tapa e interior: Santiago Erasquin

Fotos tapa e interior: Juan Pablo Vittori

©2000: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Ciudad Universitaria, pabellón II, 1428 Ciudad de Buenos Aires

Hecho el depósito que indica la ley 11.723

ISBN 950-29-0591-1

Impreso en la Argentina

*Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida,
almacenada o transmitida de manera alguna ni por ningún medio sin
permiso previo del editor.*

Agradecemos a la revista 3 puntos por haber hecho posible la visita del profesor Milstein a la Argentina, financiando su viaje, y por brindar su fundamental apoyo en la organización y difusión de la conferencia dictada en nuestra casa de estudios.

Agradecemos a la Fundación Ciencias Exactas y Naturales por financiar la impresión de este libro, demostrando de esa manera su interés por la divulgación de la actividad científica y académica.



Índice

| | |
|--|----|
| <i>Prólogo</i> | 9 |
| <i>Biografía de César Milstein</i> | 13 |
| <i>Conferencia</i> | 17 |

Prólogo

En diciembre de 1999, con el apoyo económico de la revista 3 Puntos, el doctor César Milstein realizó una visita a nuestro país cuyo punto culminante fue la conferencia titulada “Los anticuerpos monoclonales”, dictada en el Aula Magna de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, facultad en la que Milstein se licenció y doctoró en Química.

Fue realmente reconfortante observar la sala colmada por las más de 1200 personas que asistieron a la conferencia – muchas de ellas sin formación científica– y que, más tarde, tuvieron la posibilidad de participar de un prolongado diálogo con un panel formado por el propio Milstein, Gregorio Klimovsky, Víctor Penchazadeh, Mariano Sigman y quien suscribe, coordinado por Jorge Halperín.

La situación tenía una cierta connotación simbólica: el más prestigioso científico argentino de los últimos tiempos en la facultad con mayor concentración (y mayor diversidad) de científicos del país. Fue un oasis de entusiasmo en un período –que lleva ya bastante tiempo– en el que los científicos argentinos se preguntan reiteradamente si algún grupo significativo de la sociedad argentina, y en particular de la clase dirigente argentina, está realmente interesado en la ciencia, comprende las implicaciones positivas que ésta tiene para el país y está dispuesto a hacer algún esfuerzo por ella.

La conferencia que dio origen a este libro lleva por subtítulo “La curiosidad como fuente de riqueza”. Es una elección muy atinada que sintetiza brillantemente tanto la base de la ciencia –la curiosidad, que mueve al ser humano a tratar de comprender la naturaleza– como su aplicación: inevitablemente, el avance científico produce desarrollo tecnológico y mayor riqueza. Es una apreciación sintética, y por lo tanto no toma en cuenta matices, pero en esencia es correcta.

Cada día se hace más innegable el hecho de que no puede haber desarrollo sin ciencia (considerando a la actividad científica como condición necesaria para el desarrollo, pero no suficiente). Los países desarrollados, o que aspiran a serlo, tienen cada vez más y mejor ciencia, y los otros –entre los que está Argentina, lamentablemente– no la tienen. Así de sencillo. De un subtítulo de una conferencia se llega a una conclusión siniestra para nuestro país. Si no apoyamos la ciencia, cada vez será más débil, cada vez produciremos productos relativamente menos elaborados, cada vez nos alejaremos más no solamente de Estados Unidos y Europa sino de Chile y Brasil. Nuestros jóvenes graduados no encuentran ámbito propicio en nuestro país y por eso deciden sumarse a la cada vez más numerosa colectividad científica argentina en el extranjero, casi ninguno de cuyos miembros vuelve porque no se les da mínimas garantías de apoyo y, sobre todo, de respeto.

El doctor Milstein nos invitó en su charla a seguirlo en una aventura intelectual que comenzó comparando a los científicos con los exploradores (con la ventaja, para los primeros, de que la ciencia no llega nunca a la meta porque cada descubrimiento realizado genera nuevos descubrimientos por hacer) y que terminó con recomendaciones sobre la importancia de las ciencias básicas y el papel de los investigadores.

En esencia, nos dice Milstein, nuestros gobernantes no consideran importante la ciencia, no la apoyan y, por lo tanto, los científicos se van; por otra parte agrega que la evaluación de la calidad en ciencia no es tarea para burócratas ni mucho menos para políticos, y para garantizar la excelencia científica tenemos que recurrir, además de a los investigadores locales, a los internacionales. Este sencillo programa (apoyar económica y políticamente la ciencia y garantizar su excelencia recurriendo a las evaluaciones internacionales), al cual siempre se han opuesto tenazmente tanto los burócratas como muchos políticos y, es triste decirlo, algunos científicos locales, requiere solamente un poco de dinero –indispensable a pesar de la crisis presupuestaria– y decisión política. Esperemos que alguna vez se concrete, y que nuestro próximo Premio Nobel no esté viviendo desde hace muchos años en el extranjero.

Pablo Jacovkis ■

Decano de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



Biografía

César Milstein nació en la ciudad de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, el 8 de octubre de 1927. Hijo de inmigrantes judíos, fue el segundo de tres hermanos.

Cursó sus estudios secundarios en el Colegio Nacional de su ciudad natal y en 1944 obtuvo el título de Bachiller. Al año siguiente se trasladó a la Capital Federal para ingresar en la carrera de Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires. Una vez que consiguió su graduación, en 1952, comenzó a elaborar su tesis doctoral, que se vio interrumpida durante un año, período en el cual se dedicó a recorrer Europa a dedo junto con su reciente esposa, Cecilia Prilleltensky.

El doctorado en Química lo obtuvo en 1957, bajo la dirección del profesor Andrés Stoppani, mediante una tesis sobre estudios de cinética de la enzima aldehído deshidrogenasa, trabajo por el cual también consiguió el premio especial de la Sociedad Bioquímica Argentina.

Durante el tiempo que empleó en llevar a cabo la investigación para su tesis doctoral, Milstein alternó la Facultad con su trabajo en bioquímica clínica, necesario para subsistir teniendo en cuenta que no recibía subsidio alguno por su labor científica.

Una vez alcanzado el grado de doctor, Milstein fue seleccionado por concurso como investigador en el Instituto Nacional de Microbiología Carlos Malbrán, organismo que por ese entonces, y con la dirección del doctor Ignacio Pirotsky, vivía sus años dorados.

En el mismo año 57, fue becado por el British Council para desempeñarse en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge. Allí inició sus trabajos sobre el mecanismo de activación metálica de la enzima fosfoglucomutasa, a través del cual comenzó a colaborar con Frederick Sanger, científico destacado y Nobel de Química.

Volvió a la Argentina en el 61, luego de haber obtenido su posdoctorado en Gran Bretaña, y fue nombrado jefe del Departamento de Biología Molecular del Malbrán, dónde estuvo por primera vez a la cabeza de un grupo de investigación.

En 1962, tras la caída del gobierno de Arturo Fondizi, el Malbrán –al igual que muchos otros organismo públicos– se vio intervenido y comenzó un largo período de persecuciones políticas que se tradujeron en despidos, amenazas y entorpecimiento del trabajo cotidiano.

Con un Instituto diezmado por el accionar del autoritarismo, Milstein, junto con su esposa, decidió dejar el país en el 63 para volver a Cambridge y reiniciar su traba-

jo junto a Sanger en la División de Química de Proteínas del Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigación Médica. Pero esta vez sus investigaciones sobre enzimas quedarían relegadas: Sanger consiguió convencer a su discípulo de cambiar su área de trabajo. A partir de ese momento, la inmunología se convirtió en el mayor interés de Milstein, y tan es así que, al muy poco tiempo de investigación, obtuvo los primeros resultados significativos en la materia, los mismos que le permitieron convertirse en miembro de la Royal Society y más tarde lo harían merecedor del Nobel.

Siempre desempeñándose en Gran Bretaña, junto con Georges Köhler, en 1975 inventaron un método para producir anticuerpos monoclonales de máxima pureza.

En el 83 se convirtió en Jefe y Director de la División de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Cambridge, momento en el que obtuvo la nacionalidad británica.

Debido a sus investigaciones, en 1984 recibió el Premio Nobel de Medicina y Farmacología compartido con Köhler.

Hasta la fecha, Cesar Milstein continúa trabajando en el mismo laboratorio en el que desarrolló los pasos más significativos de su carrera ■



La aventura es una de las grandes fascinaciones del género humano. La mejor manera de entusiasmar a un niño para que emprenda una nueva tarea es convencerlo de que es una aventura. Y, más tarde, el entusiasmo por las aventuras será el centro de la vida de muchos hombres y mujeres.

Entre todas las aventuras, las más fascinantes son las exploraciones a lo desconocido, desde la exploración polar hasta la búsqueda del doctor Livingstone, desaparecido en medio del Africa. Y esa fascinación reside en que la curiosidad es uno de los motores de la evolución. Incluso los animales inferiores son curiosos y buscar comida o albergue en terreno desconocido es una aventura también para ellos. La ciencia tiene la fascinación de la aventura porque, por encima de todo, es una exploración a lo desconocido. Permítanme ustedes leer dos pasajes de dos grandes aventureros. El primero nos dice: "El poder que ejerce lo desconocido sobre el espíritu humano, nos empuja hacia los poderes escondidos y secretos de la Naturaleza, desde el ínfimo mundo del microscopio, hasta la inmensidad desconocida del Universo. (...) A pesar de todas las declaraciones de uno u otro tipo de interés económico, fue éso lo que, en nuestro corazones, nos empujó una y otra vez, pese a todos los contratiempos y los sufrimientos".

Esto lo escribió el más grande de los exploradores polares, Roald Amundsen.

El segundo dice: "Espero que de todo lo que les he dicho, hayan ustedes recibido la impresión de que ya no nos encontramos perdidos en un mar sin límites, pero que hemos vislumbrado la tierra que tenemos la ilusión –y, más que ilusión, la convicción– nos ofrecerá ricos tesoros para la biología y la terapia"

Estas fueron las palabras de clausura de una conferencia del padre de la inmunoquímica, Paul Ehrlich.

Noten ustedes que, en ambos textos, la pasión de Amundsen por lo desconocido y el entusiasmo por la nueva tierra vislumbrada por Ehrlich, están unidas a promesas de potencial económico o ricos tesoros para la biología y la terapia. Exploradores y científicos especulan con esas prometidas riquezas para poder solventar su sed de aventuras. Ciertamente en muchos casos esas promesas no llevan muy lejos. Ni los viajes de Amundsen ni los de otros exploradores que buscaron en el hemisferio Norte un pasaje navegable que uniera el Pacífico con el Atlántico, tuvieron impacto económico. Pero ellos fueron la excepción más que la regla. Empezando por Colón, que cambió la historia a ambos lados del Atlántico, y terminando en la gran aventura de la biología molecular y de la física moderna que están cambiando en forma no menos radical el mundo en que vivimos.

EL MOTOR DE LA CIENCIA

Todos ustedes son o fueron estudiantes y, como yo, en más de una oportunidad les habrá parecido aburrido y tedioso tener que aprender un tema u otro, y ello es así porque nuestro aprendizaje, si bien en cierta forma es un descubrimiento, no involucra ninguna aventura. Pero sí fue

una aventura la que vivieron quienes contribuyeron a llenar los libros que hay que estudiar para aprobar los exámenes.

El motor de la ciencia es la curiosidad con las preguntas constantes: ¿Y eso cómo es? ¿En qué consiste? ¿Cómo funciona? Y lo más fascinante es que cada respuesta trae consigo nuevas preguntas. En eso los científicos le llevamos ventajas a los exploradores, cuando creemos haber llegado a la meta anhelada, nos damos cuenta de que lo más interesante es que hemos planteado nuevos problemas para explorar.

Pero pongamos las cosas en perspectiva tomando como ejemplo la inmunología. El primero y más espectacular éxito de la inmunología es un gran ejemplo del triunfo de la práctica médica y no de las ciencias básicas. Hace ya más de dos siglos que un médico inglés, Jenner, descubrió que las personas inoculadas con material tomado de lesiones de viruela de las vacas quedaban protegidas contra la viruela para el resto de sus vidas. La vacunación contra la viruela se extendió en poco tiempo al resto del mundo. En el año 1967 la Organización Mundial de la Salud inició un programa de erradicación de la enfermedad. La viruela, que junto con la sífilis diezmo las poblaciones indígenas de nuestro continente, registró su último caso en las Américas en 1971, y en octubre de 1977 se registró el último caso mundial de viruela endémica que afectó a un joven cocinero de un hospital del puerto de Merka, en Somalia. La erradicación fue un gran triunfo de la medicina pero también un desastre económico para las industrias farmacéuticas que fabrican drogas para mejorar o incluso curar a los enfermos. Erradicar una enfermedad no tiene

futuro económico.

El descubrimiento de los microbios, culminando con la microbiología como nueva disciplina científica, fue una gran aventura con muchos participantes, magníficamente relatada por Paul de Kruif en un libro titulado “Los cazadores de microbios”, y que ha sido una fuente de inspiración para mí y para muchos otros biólogos. Si hablamos de vacunación y de microbios podemos preguntarnos por qué razón la vacunación previene infecciones. Esa es la pregunta que da origen a uno de los grandes capítulos de la biología básica y también de la biotecnología moderna con sus inmensas repercusiones económicas.

A fines del siglo pasado, Behring y Kitasato (trabajando en el laboratorio de Koch, el padre de la microbiología), descubrieron que el suero de un animal infectado con tétanos contenía una sustancia que era capaz de interferir con la infección. La transferencia de un suero inmune para prevenir o curar infecciones, se llama inmunización pasiva y, por lo tanto, a la sustancia desconocida que era capaz de transmitir esa propiedad se la llamó anticuerpo. Esto fue un descubrimiento fundamental pero también un gran éxito comercial. Dos años más tarde, von Behring desarrolló una toxina antidiftérica con la que inició una industria farmacéutica floreciente (al mismo tiempo que le valió en 1901 el primer Premio Nobel de Medicina). El otro héroe de esta historia, Kitasato, volvió al Japón y fundó un laboratorio que fue incorporado al Instituto Imperial Japonés para el Estudio de las Enfermedades Infecciosas.

LA CURIOSIDAD POR LOS ANTICUERPOS

El descubrimiento de los anticuerpos tuvo muchas

más repercusiones que la que sus descubridores pudieron imaginar. Esas repercusiones surgieron cuando se planteó la pregunta de por qué un anticuerpo reconoce y neutraliza al microbio invasor pero no afecta al paciente: en otras palabras, el origen de la especificidad de los anticuerpos. Este es un tema que le preocupó a Ehrlich por mucho tiempo y al cual dedicó la conferencia de la cual extraje el pasaje que leí hace unos minutos. Pero Ehrlich llegó a una conclusión errónea. El no podía aceptar la idea de que esos anticuerpos fueran inventados por el organismo específicamente para neutralizar la infección. El hecho de que los animales fueran capaces de aprender a reconocer nuevas moléculas, era difícil de reconciliar con su convicción visionaria de que la química era el trasfondo de todos los procesos biológicos.

Quien se preguntó si existía límite en el número de anticuerpos específicos que un animal podría producir, fue Landsteiner. Su conclusión fue que no había tal límite. La inyección, en animales, de una variedad interminable de productos químicos, naturales o artificiales, siempre daba lugar a anticuerpos que reconocían específicamente a la sustancia inyectada o antígeno, como lo llamamos en esa jerga que tanto dificulta nuestra comunicación con el público. Esa respuesta abrió la caja de Pandora que despertó la curiosidad de muchos científicos durante muchos años y que a mí personalmente me ha mantenido en ascuas por casi 40 años. Es más, un animal inmunizado no sólo es capaz de producir anticuerpos específicos sino que esos anticuerpos mejoran a medida que el proceso de inmunización progresa. Mejoran porque la afinidad y especificidad de los anticuerpos va aumentando mientras subsiste

el antígeno circulante. A eso lo llamamos la maduración de la respuesta inmune. El primero que se dio cuenta de que durante la inmunización no solamente aumentaba la cantidad sino también mejoraba la calidad de los anticuerpos fue un científico alemán llamado Krause. El mismo Krause que años más tarde vendría a la Argentina a fundar el Instituto Malbrán y que terminó siendo un símbolo de las peripecias de la ciencia en la Argentina.

El uso de anticuerpos en terapia fue una consecuencia implícita de su descubrimiento. Descubrimiento y utilidad iban de la mano. Por el contrario, la explotación del principio del reconocimiento molecular es un proceso largo y elaborado. Tomen en cuenta que el que inventó el concepto de "bala mágica" fue Ehrlich y, pese a sus enormes contribuciones en inmunoquímica, la bala mágica de Ehrlich no consistía en anticuerpos. La adopción del concepto de bala mágica fue aplicado a los anticuerpos sólo después de la invención del primer método para producir anticuerpos monoclonales a voluntad, y eso fue 75 años más tarde.

El primer ejemplo del uso de los anticuerpos con una función utilitaria, totalmente despojada de su función biológica, la proporcionó el mismo Landsteiner a principios de siglo. Landsteiner observó que el suero de algunos individuos era capaz de aglutinar en un tubo de ensayo los glóbulos rojos de otros individuos. Esa simple observación dio lugar a dos descubrimientos trascendentales. El primero fue el descubrimiento de los grupos sanguíneos, que fue el motivo del premio Nobel en 1930. El otro fue el uso de anticuerpos como herramienta de diagnóstico. Este principio fue rápidamente modificado y explotado en otras

áreas de medicina, por ejemplo en el diagnóstico de la sífilis en la clásica reacción de Wasserman.

Pero volvamos a la importancia de la observación de que es posible preparar anticuerpos específicos contra cualquier antígeno. Piensen ustedes en la potencialidad de esa observación. Imaginemos una gran mezcla de sustancias químicas entre las cuales nos interesa sólo una de ellas. Una sustancia entre millones y millones. Es como una aguja en un pajar. Si tenemos un anticuerpo específico contra esa sustancia, ese anticuerpo puede funcionar como un imán capaz de ignorar la existencia del pajar y reconocer exclusivamente la aguja. A los ojos de un anticuerpo, el pajar no existe. Ese simple concepto dio lugar a lo que se dio en llamar «inmunoensayos», que permitieron la medición precisa de hormonas y muchas otras sustancias no sólo en medicina sino también en química analítica en general. Los inmunoensayos introdujeron los anticuerpos para su uso como herramienta analítica de importancia fundamental en áreas que nada tenían que ver con la inmunología. El problema era que para preparar un anticuerpo específico era necesario utilizar agujas puras.

LAS CÉLULAS COMO FÁBRICAS

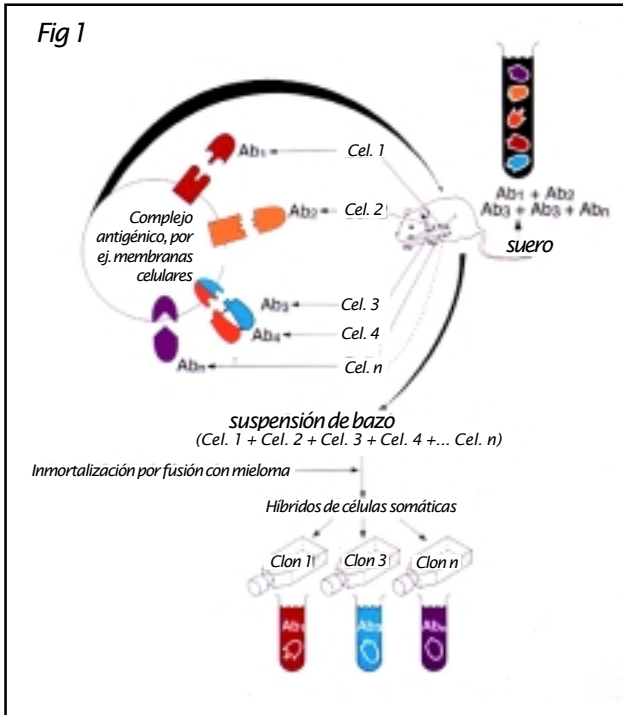
Paralelamente a estos progresos, algo mucho más importante estaba pasando y su motivo otra vez era la curiosidad por saber qué son los anticuerpos y en qué consisten. Las primeras respuestas vinieron gracias al desarrollo de las técnicas de química de proteínas. Reconocer que los anticuerpos son una familia de proteínas fue un camino largo y lleno de dificultades. Lo difícil es que se trata de una familia de proteínas, extremadamente simila-

res. Por mucho tiempo, y hasta la década del 70, el gran problema de la inmunología fue saber si los anticuerpos eran derivados de una sola proteína con una secuencia única de aminoácidos o una mezcla de proteínas muy similares. A principios del 70 los inmunólogos estábamos convencidos de que se trataba de una mezcla de gran complejidad. Pero muy pocos estaban dispuestos a aceptar que no se trataba de centenares de miles sino de un número mucho mayor de moléculas muy parecidas pero distintas. Las técnicas más sofisticadas de purificación de proteínas no eran suficientes para preparar anticuerpos químicamente puros que nos permitieran analizar su estructura. Incluso fracciones purificadas por cromatografía de afinidad usando el antígeno específico daban lugar a mezclas complejas. Recién en el 75 fue posible preparar anticuerpos químicamente puros y capaces de ser cristalizados. Y eso no fue el resultado de progresos en purificación de proteínas sino el producto de un simple truco experimental.

Para esa época ya estaba generalmente aceptado, aunque no demostrado formalmente, que cada célula producía una molécula de anticuerpo y sólo una. La teoría del origen clonal de los anticuerpos fue propuesta por Burnet, lo que le valió el premio Nobel en 1960. Como hay miles y miles de clones de células, cada una produciendo un anticuerpo diferente, los anticuerpos secretados se mezclan en el suero y a partir de ese momento es imposible purificarlo. La simple observación de la figura 1 sugiere algo que hoy en día es obvio pero que no era obvio en su momento. Lo importante es purificar las células productoras del anticuerpo.

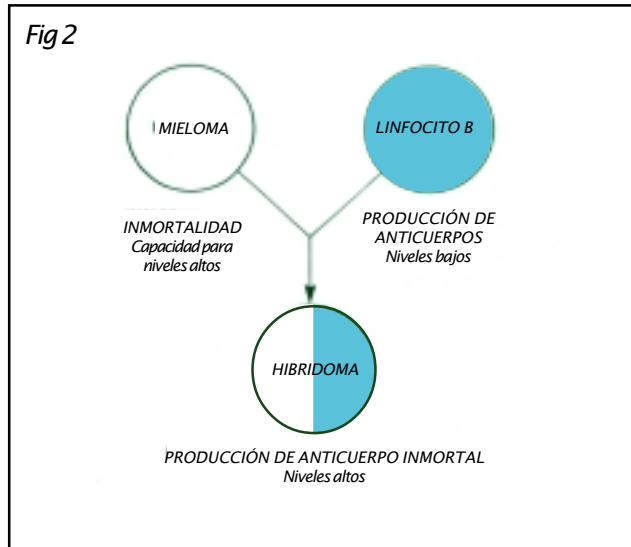
Cada célula produce un anticuerpo puro. Pero una

Fig 1



célula no produce una alta cantidad de anticuerpo y por lo tanto se necesita cultivar esas células para tener poblaciones de células idénticas que produzcan cantidades ilimitadas de anticuerpo. Esto no sería posible porque las células (o linfocitos B, en nuestra jerga) productoras de anticuerpos se mueren muy rápidamente fuera del organismo. El truco, pues, fue inmortalizar las células.

Esto se logró fusionando la célula productora de anticuerpos con células de origen tumoral (un mieloma) que tiene la capacidad de crecer en un tubo de ensayo. Los híbridos heredan las propiedades de las dos células madres: la capacidad de producir y secretar anticuerpos específicos y la de crecer indefinidamente en tubos de en-



sayo o, más precisamente, en botellas de cultivo celular (ver figura 2).

Por supuesto, los híbridos son una gran mezcla que representa la mezcla inicial de células del organismo, pero como son inmortales y crecen en tubos de ensayo se pueden separar individualmente (ver figura 1).

APORTES DE LA INVESTIGACIÓN

Una sola célula que crece y se multiplica en una botella de cultivo da lugar a un gran cultivo monoclonal que puede ser mantenido congelado por tiempo indefinido y que produce siempre el mismo anticuerpo. El cultivo del primer híbrido clonado –hibridoma, en nuestra jerga– está todavía en mi congeladora y en estos días cumple 25 años.

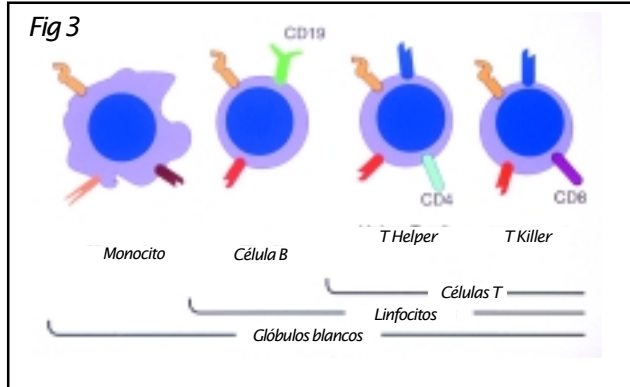
Las consecuencias de este truco fueron mucho más que un instrumento para satisfacer nuestra curiosidad. Esta

capacidad para producir cantidades indefinidas de un anticuerpo específico tuvo un efecto inmediato en la industria farmacéutica en el área de los análisis clínicos. El ejemplo más interesante fue el desarrollo del diagnóstico precoz y casero del embarazo que, me imagino, todos ustedes conocen y muchas de las damas presentes en algún momento u otro habrán usado en la intimidad de sus casas.

Ustedes recordarán que para preparar anticuerpos por métodos tradicionales, que han sido por muchos años usados en radioinmunoensayos, se necesitaban sustancias (antígenos) puros. Lo que la figura 1 indica es que es posible preparar anticuerpos puros partiendo de sustancias impuras. Más importante aún es el hecho de poder resolver una mezcla de sustancias muy complejas preparando anticuerpos. Cada anticuerpo monoclonal reacciona con una de las sustancias de una mezcla compleja pese a que posiblemente esa sustancia sea desconocida. Esa propiedad fue inmediatamente explotada para identificar componentes desconocidos de las paredes celulares. Por ejemplo, cuando uno observa al microscopio la mezcla de células blancas de la sangre, puede diferenciar unos pocos tipos celulares, como linfocitos y monocitos. Pero el número de tipos de células es mucho mayor que aquello que muestran las diferencias morfológicas. Los linfocitos mirados al microscopio son grandes, medianos o pequeños, pero hay muchos tipos, y estos no pueden diferenciarse morfológicamente.

Por otro lado, las proteínas presentes en la pared celular son de gran complejidad y no compartidas por todos los linfocitos (ver figura 3). Esas diferencias pueden ser fácilmente reconocidas por anticuerpos monoclonales

y en nuestra jerga las llamamos antígenos de diferenciación: sustancias que distinguen distintas poblaciones de células. Por ejemplo, uno puede preparar anticuerpos monoclonales inyectando linfocitos humanos. Algunos



anticuerpos reaccionan solamente con algunos linfocitos pero no con otros porque reconocen distintos componentes de la pared celular, o sea distintos antígenos de diferenciación. Eso es fácil de visualizar marcando las células con un anticuerpo monoclonal que lleva consigo fijada una sustancia coloreada o, más comúnmente, fluorescente. Las células van a aparecer al microscopio como células fluorescentes o coloreadas dependiendo de sus antígenos de diferenciación. Lo importante de este procedimiento es que se preparan así anticuerpos monoclonales que distinguen moléculas de las paredes celulares previamente desconocidas. Esta fue probablemente la contribución más importante de los anticuerpos monoclonales. Antes del primer estudio de este tipo, solamente se conocían unos pocos constituyentes de la pared celular. Hasta ahora y a través de talleres colaborativos internacionales –en los cuales han participado científicos argentinos– se han ca-

racterizado, solamente entre las células blancas de la sangre, cerca de 200 moléculas de diferenciación, cada una de ellas reconocida por múltiples anticuerpos monoclonales generados independientemente en centenares de laboratorios del mundo.

Aparte de satisfacer nuestra incesante curiosidad, esos nuevos conocimientos son una fuente enorme de aplicaciones médicas. Por ejemplo, el anticuerpo CD4 reconoce alrededor de un 20 por ciento de linfocitos de un animal. Ese anticuerpo sirvió para aislar y purificar por cromatografía de afinidad uno de esos antígenos de diferenciación, que resultó ser una proteína desconocida hasta entonces. Una vez caracterizada la proteína, fue posible definir el gen que la codifica. El mismo anticuerpo nos permitió aislar el 20 por ciento de los linfocitos de ratas inmunizadas que contienen ese antígeno de diferenciación. Las células fueron inyectadas en otras ratas y eso permitió descubrir que esas células, en conjunción con el antígeno específico, son responsables de dar señales que activan las células productoras de anticuerpos. Esas células en nuestra jerga se llaman *helpers*. Al microscopio son iguales a muchos otros linfocitos con diversas funciones y sólo pueden distinguirse por los antígenos de superficie, los antígenos de diferenciación. El mismo anticuerpo que reconoce las células permitió establecer que éstas son las células destruidas por el virus del SIDA. Más aún, que esa molécula de la superficie celular es una vía de entrada del virus. Hoy en día, es práctica médica corriente medir el progreso de la enfermedad por la disminución de linfocitos CD4 en la sangre de los enfermos. Y se puede medir la efectividad de un tratamiento por el aumento de la pobla-

ción de células reconocidas por CD4.

Por otro lado, los anticuerpos monoclonales le dieron posibilidades insospechadas al viejo sueño de la bala mágica. ¿Por qué no usarlos, por ejemplo, para combatir infecciones o tumores? La idea era muy simple: tomamos un anticuerpo monoclonal y, en lugar de ponerle una sustancia fluorescente, ponemos una sustancia radioactiva unida a los anticuerpos específicos de tumores; y matamos el tumor. En la práctica esa simple idea tardó mucho en dar frutos porque, entre otras cosas, no hay tales componentes específicos de tumores. Ese era uno de los problemas que había que resolver, y una de las vías para intentar resolverlo es usar los antígenos de diferenciación a los que me acabo de referir, que están presentes en algunos tumores, pero también en algunas células normales, y aceptar el daño de matar alguna de esas células. Ello no es tan grave si las células se pueden recuperar después del tratamiento.

Otro de los problemas fue que los anticuerpos eran de ratón o rata. Si uno inyecta esos anticuerpos monoclonales en personas, eso da lugar a un rechazo inmunológico. Para los humanos, el anticuerpo de ratón es una sustancia extraña que da origen a una respuesta inmune que la eliminará del organismo. Por varios motivos técnicos, es muy difícil producir anticuerpos de origen humano usando la técnica de fusión descrita anteriormente. La primera solución a ese problema vino en forma insospechada y fue de nuevo el resultado de la curiosidad. ¿Qué quiere decir especificidad? Más concretamente: ¿Por qué un anticuerpo es específico y cómo adquiere esa propiedad?

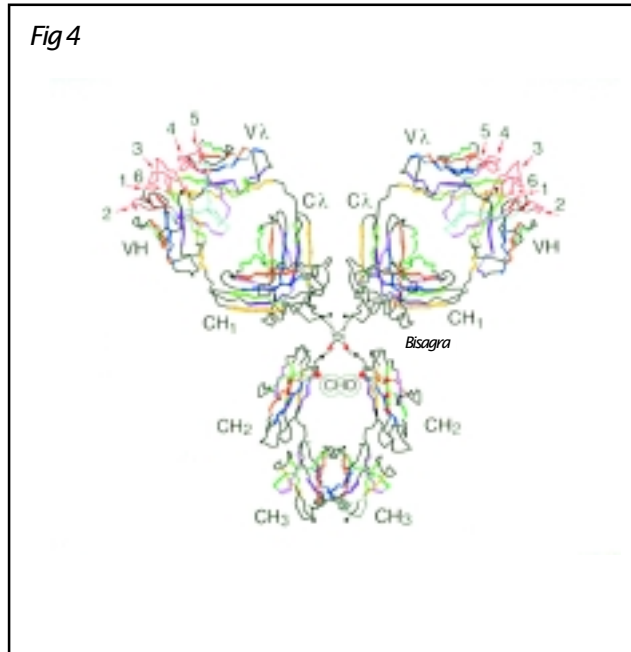
LOS ANTICUERPOS HUMANIZADOS

La técnica de los hibridomas permitió preparar cantidades ilimitadas de anticuerpos puros, con lo cual se pudieron hacer estudios químicos, incluso resolver su estructura tridimensional usando técnicas cristalográficas convencionales. Fueron largos años de trabajo y me alegra poder decir que entre los científicos que sobresalieron en estos esfuerzos hay un argentino de nombre Roberto Poljak. A través de esos estudios hemos aprendido que todos los anticuerpos tienen una estructura básica común, formada por un par idéntico de dos cadenas polipeptídicas llamadas cadena pesada y cadena liviana, que están unidas por puentes disulfuro.

Vista en tres dimensiones, la molécula es una Y con un andamiaje rígido formado por placas de plegamientos beta en el cual están injertados seis segmentos (ver figura 4), de formas y longitudes variables. Esos injertos están distribuidos estratégicamente a lo largo de la cadena polipeptídica de tal manera que en la estructura espacial se acercan y forman una región definida en la parte superior de la Y. A la parte rígida de la estructura la reconocemos como el marco -en inglés framework- y a los injertos variables se los conoce como CDR (en inglés, complementary determining residues). Son estos últimos los que definen estructuras infinitamente variables, cada una de ellas reconociendo a una y sólo una sustancia extraña diferente, así como una llave reconoce una sola cerradura.

Esa estructura lleva consigo la clave de la solución de cómo preparar anticuerpos casi humanos. Es simplemente cuestión de tomar esos pequeños fragmentos obteni-

dos de los anticuerpos monoclonales específicos del ratón y, usando métodos de ingeniería genética, sustituir con ellos

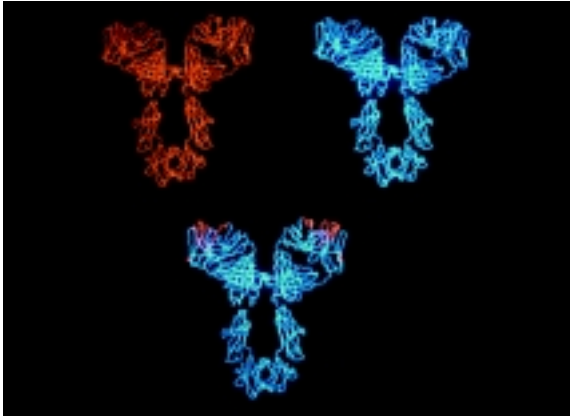


los segmentos equivalentes de cualquier anticuerpo humano (ver figura 5). En la práctica, el procedimiento es más simple pues lo que se hace es injertar los fragmentos genéticos del anticuerpo de ratón en los trozos de ADN que codifica el andamiaje rígido de genes humanos. A los productos de este proceso se los llama anticuerpos humanizados.

Dado que los pequeños injertos tienen una estructura complementaria con la estructura del antígeno –independientemente del animal de origen– el producto final no es básicamente distinto de un anticuerpo humano y por lo tanto no es reconocido por el sistema inmune como sustancia extraña. Este experimento, repetido y mejora-

do, tuvo una enorme repercusión en el uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales. A él se agregaron los avances en los estudios de los antígenos de diferenciación y otros avances de ciencia básica que, traducidas a usos prác-

Fig 5

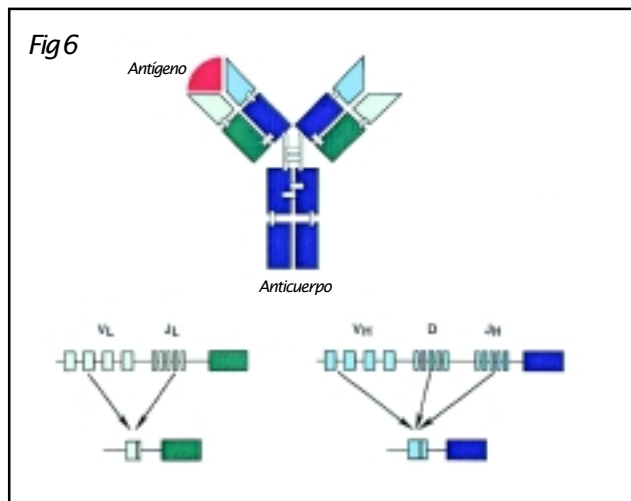


ticos, han significado nuevos tratamientos para varias enfermedades. Para dar un dato numérico, les diré que en este año las ventas de anticuerpos monoclonales usados en terapia se elevan a 1000 millones de dólares y que para el 2000 se estima que crecerán a 3000 millones, lo que representa el 20 por ciento de las ventas de todos los productos biotecnológicos destinados a terapia. ¡Y todo eso porque queríamos saber qué son los anticuerpos y por qué son específicos!

Es hora de que vuelva a la pregunta más candente de toda esta historia, aquella a la que Ehrlich le dio una respuesta falsa. Hemos visto que los anticuerpos son como llaves que reconocen cerraduras específicas. El animal es como un cerrajero capaz de fabricar una llave mirando una

cerradura que no vio nunca y sin tener una llave para poder copiar. La instrucción para hacer una proteína está inscrita en el ADN celular que se hereda de nuestros padres y madres, pero la instrucción para hacer un anticuerpo es más compleja.

Todos los anticuerpos están formados por la unión de dos tipos de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, y cada una de ellas por dos grandes regiones: la región constante y la región variable. Dentro de la región variable están los segmentos que habíamos visto, y que son responsables de la especificidad del anticuerpo. Al nivel del ADN, la región variable está codificada por fragmentos separados llamados V, J, y D (ver figura 6). Estos fragmentos se unen en forma combinatoria, por ejemplo uno de los llamados V con un J. Y el conjunto al que llamamos VJ con otro llamado CL. Eso forma la subunidad L. La otra subunidad, o cadena pesada H, es similar excepto que incluye otro fragmento que llamamos D. Dado que estos elementos se unen combinatoriamente, el número total



de moléculas formadas es mucho mayor que el número de fragmentos individuales. Por ejemplo, los humanos tienen menos de un centenar de fragmentos V para cada cadena, cinco o seis J y unos 25 D. Esos 200 fragmentos unidos combinatoriamente forman alrededor 4 millones de estructuras distintas.

Pero hay otro factor de diversificación. El mecanismo molecular que une a los fragmentos lleva involucradas variaciones al azar, de tal manera que la unión de dos fragmento definidos da lugar a la formación no de una sino de hasta 5 ó 10 o incluso más estructuras que difieren una de la otra muy ligeramente por los residuos que aparecen en el límite que une a los dos. O sea que los 200 fragmentos heredados por un recién nacido dan lugar, en teoría, a un número absurdamente grande, superior a 1 000 millones de estructuras. En el ratón los números son similares. Recordando que cada célula sólo expresa una estructura, nos damos cuenta de una paradoja, porque el número de linfocitos B de un ratón no llega a 10 millones. O sea que un animal sólo puede expresar una fracción del total que teóricamente puede producir. Por lo tanto, desde un punto de vista inmunológico, el repertorio de un animal es distinto al de su hermano gemelo. Por razones que no voy a explicar, hay ciertas estructuras mucho más probables que otras y por lo tanto esta individualidad está sobrepuesta a estructuras comunes a todos los animales de una especie. Por lo tanto, cuando una sustancia extraña, bacteria, virus, toxina, entra en el organismo, se encuentra enfrentada con millones de linfocitos B que llevan en sus superficies esas moléculas. Cada célula con una molécula diferente.

Aquellas células que por casualidad contienen en su superficie moléculas complementarias al antígeno reconocen la interacción y se multiplican. Pero además de multiplicarse ponen en funcionamiento un nuevo mecanismo molecular que les permite alterar ligeramente su ADN para producir nuevas versiones del anticuerpo que difieren ligeramente de la original. O sea que, inducido por el antígeno, aparece un nuevo proceso de diversificación estructural. Ese proceso se basa en hipermutaciones, es decir, mutaciones somáticas restringidas a un segmento de un millonésimo del ADN, que codifica la región variable. La velocidad de mutación (10^{-3} /base/división celular) es 10 mil veces más alta que la observada en otros genes. La gran mayoría son sustituciones puntuales.

Como los cambios son imprevisibles, dado que las mutaciones no son dirigidas, la mayor parte de ellas son malas y las células que las expresan mueren. Literalmente, se suicidan por un mecanismo que se llama apoptosis. Pero, a lo mejor, una de cada diez o veinte de las variantes produce un anticuerpo mejor. En ese caso el antígeno no permite que entre en apoptosis y que muera. Por el contrario, la interacción entre el antígeno y el anticuerpo de la superficie celular manda señales al núcleo de la célula para que se divida más rápidamente. Entramos pues en un proceso de selección darwiniana que tiene lugar en nuestro sistema inmunitario.

EL EVEREST DE LA INMUNOLOGÍA

Al principio les dije que el conjunto de los anticuerpos era una gran familia de proteínas muy parecidas unas a las otras, de una complejidad tal que los métodos químicos

no podían resolver. Ahora sabemos que la diferencia entre un anticuerpo monoclonal y otro puede ser tan pequeña como un solo aminoácido. Además entendemos el origen genético de esa familia compleja y podemos deducir las consecuencias estructurales.

Si superponemos centenares de estructuras que representan anticuerpos formados por esas dos etapas de diversificación, vemos cómo los dos procesos se complementan. Las zonas donde los anticuerpos más difieren unos de otros son mucho más restringidas en la primer etapa. La distribución de la variabilidad se hace más amplia (o sea, abarca una zona más grande de la superficie de la molécula, incluyendo un mayor número de aminoácidos) cuando el proceso de hipermutación y selección darwiniana entra a funcionar.

Cuando comenzamos a comprender esta estrategia usada por los animales para inventar anticuerpos complementarios de estructuras extrañas al organismo se nos ocurrió que quizá fuera posible imitar la misma estrategia *in vitro* usando técnicas de ingeniería genética. Cuando en una conferencia propuse la idea, una colega me preguntó para qué quería hacerlo dado que los animales eran tan eficientes en ese proceso. Le contesté que esa pregunta tenía muchas respuestas dependiendo de nuestro interés personal. Desde un punto de vista de un amante de los animales la respuesta es obvia: preparar anticuerpos sin usar animales. Para un empresario, la respuesta es que ésa podría ser una ruta de preparar anticuerpos humanos. Para mí, la respuesta es la misma que dio Mallory, el legendario montañista y escalador inglés, cuando le preguntaron por qué estaba tan desesperado en escalar el Everest. Mallory,

que poco tiempo después murió probablemente a 200 metros de la cima, contestó: "Porque está allí".

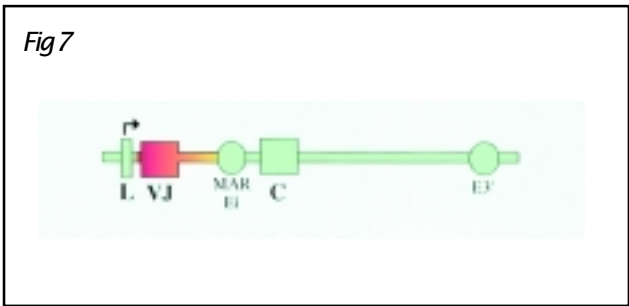
Esos tres motivos fueron los que motivaron a mis colegas de laboratorio que encontraron la forma de comenzar a subir ese Everest. La clave principal la dio otra vez un truco experimental. Winter y sus colaboradores pudieron fusionar los genes de la parte activa de los anticuerpos en la superficie de un bacteriófago, que es un virus que ataca las bacterias. El virus así modificado tiene dos elementos fundamentales de los linfocitos B. Por un lado contiene el anticuerpo en su superficie, pero al mismo tiempo tiene los genes que codifican a ese anticuerpo. Uno puede preparar así una mezcla similar a la mezcla de miles y miles de linfocitos B que en el ratón expresan la enorme variedad de anticuerpos que hemos discutido antes. Cada virus –al igual que las células B– expresa un anticuerpo y a su vez contiene el ADN que lo codifica. Entre las millones de estructuras, algunas interaccionan con cualquier sustancia que se les presente. Si bien el reconocimiento es al azar, las probabilidades son altas porque las posibilidades son enormes. No olviden que es muy fácil ganar el premio de una rifa si uno compra todos los números. Sólo es necesario purificar y luego clonar ese virus –así como clonábamos los híbridos– ese único virus entre los millones que constituyen la mezcla original.

Este proceso da buenos anticuerpos pero que generalmente no son de afinidad suficientemente alta para usos terapéuticos. Es posible, sin embargo, introducir mutaciones y mejorarlos. El proceso requiere las manipulaciones por ingeniería genética, que son largas y tediosas. Todavía no sabemos cómo superar o por lo menos igualar la efi-

ciencia de un animal en esa segunda etapa de maduración de la afinidad del anticuerpo. Eso es porque los linfocitos B tienen una maquinaria especial que dirige ese proceso de hipermutación de una manera muchísimo más simple y eficiente que lo que nosotros podemos hacer por bioingeniería. Si queremos mejorar el proceso en tubos de ensayos, tenemos que recurrir a la curiosidad y preguntar cómo hace el ratón para ser tan eficiente.

La velocidad de hipermutación somática es enorme y por lo tanto sólo posible porque se aplica exclusivamente a una zona muy pequeña del genoma (ver figura 7). Esa es la zona que contiene el fragmento variable de los anticuerpos.

Todo el resto del genoma, que es un millón de veces más grande—incluida la región constante de los anticuerpos mismos—no está expuesto a este proceso. Si no fuera así, los errores destruirían todos los anticuerpos y todas las células en un par de divisiones. En realidad, el proceso es más selectivo todavía. Ustedes recordarán que hace un momento les dije que la zona variable consistía en un an-



damiaje rígido en el cual se colocaban segmentos que daban especificidad a los anticuerpos; pues bien, la frecuen-

cia de mutación a lo largo del fragmento variable es mayor en las regiones que determinan la especificidad del anticuerpo.

¿Cómo funciona todo esto? Desgraciadamente aún no lo sabemos con precisión. Muchos equipos en el mundo, incluido el mío, han hecho de este problema su mayor preocupación. Sabemos varias cosas, como por ejemplo que el proceso está controlado por factores, muchos de ellos compartidos con factores de transcripción y factores envueltos en la reparación de fallas del ADN o corrección de errores de replicación. Pero ésta es una montaña que todavía no sabemos por dónde la vamos a escalar. Ideas no faltan, pero los avances muestran un panorama mucho más complejo de lo que creíamos. Por ejemplo, muy recientemente, basados en estudios en una variedad de ratones deficientes en uno de los factores que controlan la corrección de bases no apareadas (en inglés, mismatch repair) hemos propuesto que la hipermutación ocurre en dos etapas que utilizan factores diferentes. Como siempre, los problemas no resueltos son los más interesantes para los involucrados pero también los más difíciles de explicar a los no especialistas, así que en esta ocasión tendremos que interrumpir nuestro viaje y hacer algunos comentarios más generales.

SORPRESAS DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

Nosotros no fuimos los primeros en tratar de preparar anticuerpos monoclonales. El motivo por el cual tuvimos éxito fue debido a circunstancias favorables e imprevisibles. El factor más importante fue que nuestros trabajos previos nos habían puesto en una situación ideal para

hacer el experimento clave que en nuestra mente surgió en forma impredecible. Sin saberlo, y a lo largo de muchos años de investigaciones orientadas a satisfacer nuestra curiosidad por solucionar el misterio del origen de la especificidad inmunológica, habíamos adquirido un conocimiento íntimo de todas las técnicas y los materiales que necesitábamos para realizar un experimento que no habíamos previsto. Tanto es así que desde el momento en que iniciamos el experimento que nos llevó al primer anticuerpo monoclonal hasta que terminamos de escribir los resultados, pasaron sólo seis meses.

No menos interesante es que, al principio, nadie –nosotros tampoco– se dio cuenta de la verdadera trascendencia que tenían. Pero por lo menos nosotros nos dimos cuenta, al escribir el primer artículo, que el procedimiento podía ser valioso en medicina y en la industria. En contraste, el organismo que en Inglaterra tenía exclusivo derecho de patentar las invenciones de los institutos de investigación dependientes del gobierno concluyó que la invención de la técnica para producir anticuerpos monoclonales no era de aplicación inmediata y que ellos no veían que fuera posible explotarla comercialmente. La técnica por lo tanto no fue patentada. Pero el hecho de que la tecnología haya sido desarrollada en Inglaterra dejó una marca indeleble en el desarrollo de la biotecnología en ese país. No es una casualidad que la primera empresa de biotecnología inglesa haya tenido como punto de partida dos productos salidos de nuestros laboratorios, y que una buena parte de los progresos posteriores –y que dieron lugar a patentes importantes– tuvieran su origen en mis colaboradores o ex colaboradores. Patentes o no paten-

tes, el país era el primer depositario del *know how*.

Sí, las inversiones en la ciencia básica no son solamente inversiones por la cultura. A la larga son la base de la riqueza. Landsteiner jamás sospechó que haber despertado la curiosidad por el misterio de la biología del reconocimiento molecular iba a culminar con una revolución en la industria farmacéutica. ¿A qué multinacional se le hubiera ocurrido que el punto de partida de la próxima revolución industrial era un oscuro pero también misterioso fenómeno de genética bacteriana que llevó al descubrimiento de las enzimas de restricción? Ciertamente es una lección que los países más industrializados están comenzando a entender. Los estadounidenses han calculado que las inversiones en ciencia básica a nivel nacional son las que en el pasado han dado los mayores rendimientos en términos de ganancias, independientemente de su valor cultural.

Es cierto que las secciones de investigación y desarrollo de las grandes y no tan grandes multinacionales, y hoy en día incluso muchas compañías menores, van ampliando sus intereses en áreas menos constreñidas por aplicaciones inmediatas. Más que nada, la biotecnología moderna está erosionando en forma muy notable los límites entre lo que es ciencia aplicada y ciencia básica. Pero el interés de los industriales y los inversores seguirá siendo restringido y restrictivo porque su interés está dominado por el dinero a corto o, a lo sumo, mediano plazo. Y esto que se aplica fundamentalmente a los países altamente industrializados es mucho más serio en los países en desarrollo.

No es solamente la falta de capitales lo que hace que

la investigación y el desarrollo de industrias en países en desarrollo sea primitiva o inexistente. Los inversores más inteligentes quizá lleguen a comprender el argumento pero, en el fondo, o no están totalmente convencidos o –lo que es peor– no tienen esperanzas de que los desarrollos importantes puedan originarse localmente. Primer círculo vicioso: los inversores no valoran a los científicos locales y por lo tanto no los consultan, entonces no aprenden a valorarlos ni a utilizar sus conocimientos. Y ese desinterés por la ciencia local no es propiedad exclusiva de nuestros industriales o inversores. Los fondos estatales destinados a ciencia son vistos por nuestros gobernantes como un inevitable desperdicio de dinero. Peor aún, como no se lo considera importante, muy a menudo lo poco que se gasta se malgasta. Los pocos que mantienen el nivel son los grandes curiosos que, por suerte para este país, todavía abundan.

Segundo círculo vicioso: como la ciencia nacional no hace grandes aportes a la riqueza del país, no vale la pena apoyarla. Y como no se la apoya en forma sostenida, no tiene posibilidades de levantar cabeza y abrir oportunidades de crear riqueza. ¿Y qué pasa con los talentos potenciales que no tienen apoyo? Pues simplemente se van. Y así es cómo la Argentina, junto con su trigo y con su carne, exporta otro producto, también abundante pero potencialmente más valioso: exporta talento.

EL PAPEL DE LOS INVESTIGADORES

Pero no se trata solamente de dinero. La atmósfera y la calidad científica también tienen un papel fundamental. Los futuros científicos necesitan buenas escuelas y bue-

nos lugares de trabajo para su formación, Pero eso requiere apoyo sostenido a la excelencia. Un apoyo que no puede depender solamente de un gobierno u otro, un apoyo que debe trascender la lucha política. Para iniciar una cadena no son necesarios ni muchos individuos ni muchos equipos, lo importante es la calidad. Los grandes talentos son, por definición, pocos y deben ser protegidos y alentados. La lección de Houssay, Leloir y otros, es una indicación de lo posible. Lo trágico es cuando la cadena se rompe y los eslabones se dispersan.

Y la calidad, ¿cómo y quién define la calidad científica? ¿Y cómo se hace para promoverla? La evaluación de calidad en ciencia no es tarea para burócratas ni mucho menos para políticos. Son los investigadores quienes tienen la idoneidad para evaluar. Pero los investigadores no solamente deben ser objetivos y honestos –y no siempre lo son– sino que también deben ser percibidos como tales. Es nuestra obligación hacia nuestros colegas y también hacia la sociedad en general. ¿Con qué derecho podemos reclamar fondos sin someternos a una evaluación objetiva? El sistema de evaluación por pares no es perfecto ni mucho menos. Pero nadie ha propuesto uno mejor, y sigue siendo –con todas sus imperfecciones– el preferido en los países donde la ciencia y la tecnología son más florecientes. Lo malo del sistema estriba en los abusos y las envidias de los participantes y referees. Por ello, y por la enorme especialización de la ciencia moderna, el sistema no puede restringirse a investigadores nacionales, sino que debe extenderse al ámbito internacional.

Los países de mayor desarrollo científico recurren a investigadores de otros países (además de a los locales)

para sus revisiones de programas y para la evaluación de proyectos. Los países con menor desarrollo científico son los que menos utilizan su apoyo pese a que son los que más lo necesitan. El argumento de que los científicos internacionales no entienden los problemas y dificultades de los países menos desarrollados es hoy día más hueco que nunca. Y el argumento de que es costoso también es falso, puesto que la parte más importante de la participación internacional puede hacerse simplemente por correo.

A lo largo de esta charla he tratado de mostrar la importancia que ha tenido la curiosidad en la creación de nuevas fuentes de riqueza. Es cierto que esos frutos de la curiosidad no se transforman automáticamente en avances prácticos sino que requieren desarrollos e investigaciones dirigidas a esos fines. Lo que es difícil de inculcar entre administradores y gobernantes es que sin una base sólida capaz de producir avances fundamentales a nivel básico, las posibilidades de avances prácticos son remotas. Incluso el Japón ha comprendido ese axioma. Y eso es cierto hoy más que nunca porque la base de la potencia económica de los países en el nuevo siglo está cada vez más enraizada en la propiedad intelectual –patentes y know how– y no en su capacidad manufacturera. Hace centenares de años que el filósofo inglés Francis Bacon pronosticó que los avances en las ciencias básicas abrirían inevitablemente oportunidades de aplicación práctica. Pero –y esto es lo más importante– esas oportunidades no pueden predecirse.

Doctor César Milstein ■
