



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Fossati*, Carlos Alberto
César Milstein

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 56, núm. 2, 2022, -Junio, pp. 201-205
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53572377011>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

César Milstein

► Carlos Alberto Fossati

Doctor en Ciencias Bioquímicas, Profesor Emérito, UNLP, Investigador Superior Contratado *ad honorem*, CONICET.

Cátedra de Inmunología - Facultad de Ciencias Exactas - Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (UNLP-CONICET-CIC), La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

El presente comentario, escrito en virtud del decreto del gobierno nacional que designó a 2021 como año de homenaje al Dr. César Milstein, es una visión personal sobre el significado del desarrollo de los anticuerpos monoclonales, del aporte que brindó y brinda a la ciencia y tecnología actual y del contexto del correspondiente Premio Nobel en el ámbito de la Inmunología y las Ciencias Médicas. El objetivo de este artículo es transmitir, a modo de homenaje, algunas de mis experiencias en la especialidad y la relación profesional y personal con el creador de la producción de anticuerpos monoclonales por fusión de células somáticas, tecnología que continúa realizando grandes aportes al conocimiento.

Palabras clave: César Milstein; Anticuerpos monoclonales

César Milstein

Abstract

The present commentary, which was written by virtue of the national government decree that designated 2021 as the year of the tribute to Dr. César Milstein, is a personal vision of the meaning of the development of monoclonal antibodies, of the contribution that he has always made to the current science and technology, and of the context of the corresponding Nobel Prize within the sphere of Immunology and the Medical Sciences. The aim of this article is to share, as a tribute, some of my experiences in the specialty and my professional and personal relationship with the creator of the immense breakthrough still being delivered by his development.

Keywords: César Milstein; Monoclonal antibodies

César Milstein

Resumo

O presente comentário, escrito em virtude do decreto do governo nacional que nomeou o ano 2021 como ano de homenagem ao Dr. César Milstein, é uma visão pessoal sobre o significado do desenvolvimento dos anticorpos monoclonais, da contribuição que ofereceu e oferece à ciência e tecnologia atual e do contexto do correspondente Prêmio Nobel no âmbito da Imunologia e das Ciências Médicas. O objetivo deste artigo é transmitir, à maneira de homenagem, algumas das minhas experiências na especialidade e na relação profissional e pessoal com o criador do imenso avanço que continua nos oferecendo seu descobrimento.

Palavras-chave: César Milstein; Anticorpos monoclonais

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

César Milstein y los anticuerpos monoclonales, una visión personal

El desarrollo de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales abrió un nuevo mundo de posibilidades, no sólo para la generación de conocimientos básicos en todas las ramas de las ciencias biológicas, sino también a una infinidad de aplicaciones para la mayoría de las actividades científicas y tecnológicas que pudieran beneficiarse de moléculas proteicas homogéneas y/o diseñadas a medida de necesidades específicas.

El Premio Nobel de Medicina de 1984 fue otorgado a George Jean Franz Köhler y César Milstein, por su extraordinario desarrollo de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales, premio compartido con Niels Kaj Jerne por sus aportes fundamentales al conocimiento sobre la formación de anticuerpos y la génesis de la teoría de la selección clonal, posteriormente reformulada por Frank Macfarlane Burnet (Premio Nobel en 1960).

Esta distinción constituyó un verdadero reconocimiento a todos los científicos que, desde los albores de la Inmunología, apreciaron la crucial importancia del conocimiento y manipulación de la respuesta inmune. Puede considerarse como el zenit de decenas de años de estudios de los mecanismos de defensa contra las infecciones, mediados por efectores humorales, así también como el nacimiento de una nueva era en la Biología aplicada.

La historia de los anticuerpos es muy extensa, rebozante de avances significativos para la humanidad y muy rica en anécdotas, encuentros y desencuentros entre científicos, médicos, empresas y gobiernos, a las que no escapa la historia de los anticuerpos monoclonales. Es demasiado extensa e intrincada como para desarrollar siquiera los hechos más importantes y los antecedentes más significativos de esta evolución en un corto artículo como éste. Solamente pretendemos celebrar que en el año 2021 se cumplieron sesenta (60) años del regreso del doctor César Milstein a la República Argentina. El mismo fue declarado como "año de homenaje al Premio Nobel de Medicina, Dr. César Milstein por Decreto N° 18/2021 del Poder Ejecutivo Nacional.

No obstante, haré una breve reseña de algunos de los descubrimientos más trascendentes en la historia de la Inmunología, pero limitados a los Premios Nobel, más allá de la injusticia que esto significa.

Un poco de historia de la Inmunología

En 1901 se otorgó el primer Premio Nobel de Fisiología o Medicina, al fisiólogo y microbiólogo Emil Adolf von Behring, por sus trabajos de seroterapia. Unos años antes había desarrollado una antitoxina para tratar la difteria, enfermedad altamente mortal en esa época.

En 1908 el galardón fue otorgado a Elie Metchnikoff y a Paul Ehrlich por el descubrimiento de la fagocitosis y por avances teóricos en el conocimiento de los mecanismos de defensa contra la infección, respectivamente. En 1913 lo recibió Charles Richet por su descripción de la anafilaxia, Jules Bordet, por el Complemento en 1919 y Karl Landsteiner por los grupos sanguíneos en 1930. En 1960 se produjo otra doble premiación para la Inmunología: Peter Medawar por sus avances sobre la tolerancia inmunológica y Frank Macfarlane Burnet por la teoría de la selección clonal. Nuevamente la Inmunología recibió dos distinciones: Rodney Porter y Gerald Edelman por sus trabajos de química y estructura de anticuerpos, en 1972. En 1980 fueron tres los laureados de la especialidad: George Snell, Jean Dausset y Baruj Benacerraf por el descubrimiento del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Esta situación se repitió en 1984 con Niels Jerne, por sus aportes al conocimiento de las redes idiotípicas, César Milstein y George Köhler por el desarrollo de los anticuerpos monoclonales. Susumu Tonegawa fue galardonado en 1987 por el reconocimiento de la recombinación genética en la codificación de los anticuerpos. Peter Doherty y Rolf Zinkernagel recibieron el premio en 1996 por sus trabajos fundamentales de la respuesta inmune celular y los mecanismos de restricción de las células T a la presentación por el MHC. Otra triple premiación se produjo en 2011: Jules Hoffmann, Bruce Beutler y Ralph Steinman fueron galardonados por los avances en el conocimiento de las bases moleculares de la respuesta innata. Finalmente, en 2018 el Premio Nobel se le confirió a James Allison por sus aportes a la terapia antitumoral.

Obviamente existe una inmensa cantidad de científicos que fueron merecedores del máximo galardón que, sin embargo, no pueden ser mencionados en esta presentación. Ellos generaron un sinnúmero de conocimientos fundamentales y realizaron múltiples descubrimientos y aplicaciones significativas para el avance de la humanidad, siempre en el campo de la Inmunología.

Anticuerpos y anticuerpos monoclonales, resumen de su desarrollo histórico

Los anticuerpos se producen en respuesta al estímulo generado por un inmunógeno contra el cual el sistema inmune del hospedador fabrica distintas moléculas de inmunoglobulinas capaces de interactuar contra diferentes porciones del compuesto agresor (determinante antigénico o epítipo). Los anticuerpos fabricados por las células productoras de anticuerpos se distribuyen por la circulación (antisuero) por lo que pueden ser fácilmente obtenidos y manipulados para diversas aplicaciones. La composición de anticuerpos en un antisuero no es constante, sino que cambia con

el tiempo y varía entre individuos, aún entre animales genéticamente idénticos. Esta situación representa un obstáculo importante para su utilización y requiere un gran y costoso esfuerzo para la estandarización requerida para su uso.

Es fácil de comprender, entonces, que desde los albores de la inmunología se hayan realizado innumerables esfuerzos para generar fuentes capaces de proveer anticuerpos homogéneos a lo largo del tiempo.

Los anticuerpos son producidos por linfocitos del linaje B, los cuales, tras su estimulación, se convierten en células productoras de anticuerpos (células plasmáticas) que son secretados a la circulación (plasma). La naturaleza nos proveyó una enfermedad neoplásica (mieloma) caracterizada por células plasmáticas que se dividen descontroladamente generando un clon celular, mientras fabrican anticuerpos. Estos anticuerpos, al provenir de una sola célula ancestral, son todos iguales entre sí, o sea, son anticuerpos monoclonales químicamente homogéneos.

A principios de la década de 1970, se logró inducir la proliferación de mielomas en ratones inmunizados con un antígeno de interés, comenzando así un camino para la generación de anticuerpos monoclonales. Se desarrollaron diversas técnicas y procedimientos muy innovadores, ingeniosos y novedosos, con ese objetivo. La idea de todos ellos era lograr la proliferación indefinida de una sola célula productora de un anticuerpo predeterminado, para poder disponer de una solución que contuviera sólo el anticuerpo deseado. No obstante, solamente se lograron éxitos parciales, sin conseguirse un método eficiente para su aplicación masiva.

César Milstein, quien había regresado al país en 1961, se incorporó al Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán", pero por causa del contexto político reinante (situación alarmantemente recurrente en nuestra historia), regresó a Inglaterra en 1963. Allí se incorporó al Laboratorio de Biología Molecular del *Medical Research Council* de la Universidad de Cambridge, dirigido por Fred Sanger (quien fue dos veces premio Nobel de Química, en 1958 y 1980), donde continuó trabajando hasta su fallecimiento en 2002.

Durante su carrera realizó relevantes contribuciones científicas en el campo de la biología molecular y la inmunología que le valieron importantes premios y distinciones, incluyendo una postulación al Premio Nobel, antes de su consagración.

En 1974, George Köhler se incorporó al laboratorio de César Milstein. Entre ellos se había establecido una enriquecedora interacción científica ya que compartían temas de trabajo cercanos pero abordados desde diferentes direcciones. La unión de los conocimientos, ideas y experiencias de ambos, fructificó rápidamente, al punto que en menos de un par de años publicaron el célebre trabajo de la obtención de anticuerpos monoclonales.

Metodología de producción de anticuerpos monoclonales

Los Dres. Köhler y Milstein lograron fusionar linfocitos del bazo de ratones inmunizados con un antígeno determinado (en ese caso glóbulos rojos de carnero), con células de mieloma murino de una línea perfectamente adaptada a crecer en cultivo. Esta célula híbrida es capaz de fabricar el anticuerpo codificado por los linfocitos del bazo del ratón inmunizado, así como de duplicarse continuamente como en el mieloma. De esta forma se origina un clon celular que produce un único anticuerpo.

La técnica es simple, elegante y eficiente y permite la obtención de grandes cantidades de anticuerpos en un tiempo relativamente corto. En 1975 Köhler y Milstein publicaron en la revista *Nature*, el trabajo titulado "Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity" [Cultivo continuo de células fusionadas que producen anticuerpos de especificidad predefinida] (1).

Método de producción de anticuerpos monoclonales

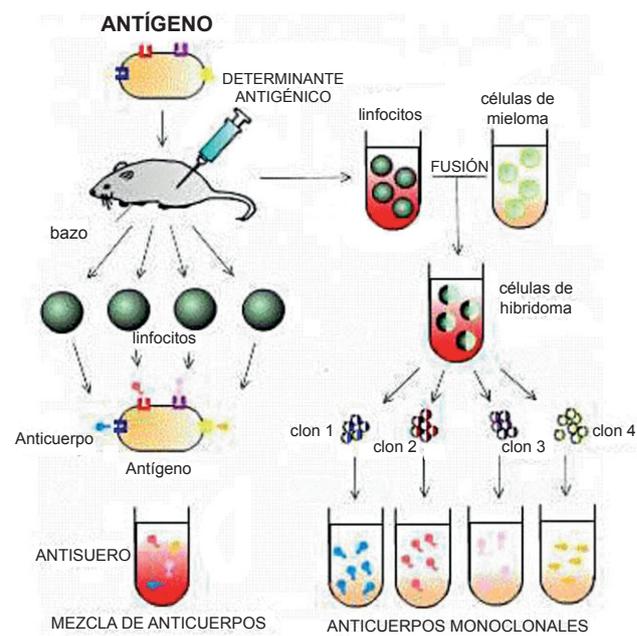


Figura 1. Procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales

En la Figura 1 se muestra esquemáticamente cómo es el procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales. Brevemente, se inmuniza un ratón con el antígeno que nos interesa (microorganismo, partes

de él, componentes purificados, etc.) hasta lograr un buen título de anticuerpos específicos en el suero del animal. Logrado esto, unos pocos días antes de llevar a cabo la hibridación, se realiza una última inoculación de una baja dosis de antígeno, “dosis de llamada”, para aumentar la respuesta. Mientras tanto, se crecen en cultivo células del mieloma adaptadas para duplicarse indefinidamente en ese medio, que tienen intacta su maquinaria de producción y secreción de inmunoglobulinas, pero carecen de la posibilidad de codificar anticuerpos. Estas células de mieloma, al fusionarse (mediante el agregado de un compuesto capaz de aumentar la interacción célula-célula, tal como el polietilenglicol) con las células productoras de anticuerpos provenientes del bazo del animal inmunizado, adquieren de esos linfocitos la propiedad de codificar el anticuerpo producto de la inmunización, producirlo y secretarlo al medio. Estas células fusionadas se denominan “hibridomas” (Fig. 1).

Tras este procedimiento, las células se cosechan, se lavan y se dividen en un número grande de cultivos. Unos días después, se podrán observar al microscopio colonias de células creciendo, algunas de las cuales podrán estar produciendo anticuerpos capaces de reconocer al antígeno inmunizante. Se analiza la presencia de los anticuerpos deseados en el sobrenadante del cultivo y las células de ese pocillo se dividen en muchos más subcultivos a efectos de generar colonias derivadas de una sola célula original. Este paso se repite hasta asegurar la monoclonalidad del cultivo. Una vez que se dispone de una cantidad adecuada de células, éstas se pueden congelar para mantenerlas viables, teóricamente por tiempo indefinido.

El anticuerpo monoclonal se puede obtener a partir de los sobrenadantes de los cultivos para, posteriormente, utilizarlo en los estudios y las aplicaciones deseadas.

La diferencia entre el anticuerpo monoclonal y el suero policlonal obtenido de los ratones se hace evidente en la parte izquierda de la Figura 1.

El suero contiene una mezcla de anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos del inmunógeno, mezcla que varía con el tiempo en cada animal; su composición en clases de inmunoglobulinas es también muy variable y diferente para cada hospedador. Finalmente, y no menos importante, el hospedador inmunizado muere al cabo de un tiempo y con él, la posibilidad de seguir generando anticuerpos.

Por otra parte, el hibridoma produce uno y sólo un tipo de anticuerpo, no varía con el tiempo, es químicamente homogéneo y su producción es ilimitada; solamente se necesita descongelar y volverlo a crecer cuando se lo necesita.

La posibilidad de producir estos reactivos homogéneos de forma simple, eficiente y duradera revolucionó las ciencias de la vida, en particular y toda la Biología y la Biotecnología en general. Quizás, el impacto mayor sea el producido sobre las Ciencias Médicas, donde el desarrollo de anticuerpos monoclonales para diagnóstico, identifica-

ción y caracterización de nuevas moléculas y células, así como su utilización terapéutica para un sinnúmero de patologías, continúa en crecimiento.

Digresiones

En lo personal, conocí a César Milstein en una de sus visitas a nuestro país. Él era amigo del Dr. Moisés Spitz, por entonces docente de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP y director de mi trabajo de tesis de doctorado. En una de esas oportunidades, en 1973, realizó una visita de muchas horas a nuestro laboratorio, actualizándonos sobre los últimos conocimientos de la inmunología y de la biología molecular de proteínas, revisando los resultados de mi trabajo y brindando ideas, las que, obviamente, fueron de gran utilidad para nosotros.

Por ese tiempo me basaba mucho en una profusa producción bibliográfica de unos autores que, además, publicaban revisiones en una importante revista de entonces. Los resultados de mis experimentos llevaban a conclusiones muy diferentes de las de ellos, independientemente de las modificaciones experimentales y del diseño que yo utilizara. Cuando Milstein estuvo en el laboratorio, se lo comenté. Él revisó mis datos, preguntó un montón de cosas y finalmente me dijo que no me preocupara porque no eran autores confiables y ya nadie les creía. Continuamos con el trabajo que fue, en definitiva, central para mi tesis de doctorado y para la primera publicación en una revista internacional de los resultados de ese trabajo.

Aún hoy me pregunto cómo esos autores seguían publicando en las revistas de revisión más importantes de la época y cómo hubiera seguido mi trabajo si no se hubiera dado una conversación directa sobre el asunto con César Milstein.

En 1975, Moisés Spitz se vio forzado a emigrar, pero antes de ello viajó a Inglaterra y visitó a Milstein en su laboratorio y trajo la reciente novedad de la técnica de hibridación. Poco después, Spitz se estableció en Londres y comenzó a trabajar en el laboratorio de César Milstein donde se familiarizó con la producción de anticuerpos monoclonales y llegó a convertirse en un experto en la materia. En 1978 se instaló en el *Saint Bartholomew's Hospital* de Londres donde creó un laboratorio de producción de estos anticuerpos, el que me tocó ayudar a montar como parte de mi estadía posdoctoral en el Reino Unido. Al año siguiente debimos trasladarnos al *National Institute for Biological Standards and Control*, también en Londres y crear un nuevo laboratorio. En esos años visité en varias ocasiones el laboratorio de Milstein en Cambridge, especialmente para trabajar en el desarrollo de algunos experimentos para los que aún no teníamos los elementos suficientes en el nuestro; obviamente manteníamos conversaciones y reuniones de trabajo y nos proveían de

insumos para facilitar nuestra tarea. El apoyo recibido fue siempre directo, abierto y desinteresado. También compartimos varias reuniones sociales con otros profesionales y amigos argentinos y de otras nacionalidades, además de británicos.

A mi regreso a la Argentina, me encontré con César Milstein en diversos congresos y reuniones realizadas en Buenos Aires, Bahía Blanca y Olavarría, así como en un par de ocasiones en que visitó nuestro laboratorio en el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral creado por Ricardo Aníbal Margni (graduado en nuestra Facultad de Ciencias Exactas), en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, donde trabajé durante muchos años.

César Milstein siempre nos escuchó, colaboró y apoyó, ya fuera donando células, anticuerpos, reactivos y, sobre todo, nos brindó opciones para salvar inconvenientes y avanzar en nuestros estudios. En una de esas oportunidades estuvimos varias horas trabajando juntos con el microscopio y los cultivos de células, ayudándonos a resolver un problema experimental.

Nunca tuve la ocasión de trabajar colaborativamente con Milstein, aunque en alguna ocasión estuvimos cerca de hacerlo, pero me ofreció y brindó su ayuda en todas las oportunidades en que se lo solicité.

Valga este pequeño recuerdo como homenaje a César Milstein y a su trayectoria.

Correspondencia

Dr. CARLOS ALBERTO FOSSATI
Correo electrónico: cafossati@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975 Aug 7; 256 (5517): 495-7.