



# Inmunología

www.elsevier.es/inmunologia



## Panorama

### César Milstein: 35 años de anticuerpos monoclonales

### César Milstein: 35 years of monoclonal antibodies

África González-Fernández<sup>a</sup> y Fernando Díaz de Espada<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Inmunología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO), Universidad de Vigo, Vigo, España

<sup>b</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain

El día 8 de octubre de 2010 Google decidió encabezar su emisión en Argentina con un curioso logo con el que se recreaba artísticamente el mundo de los anticuerpos monoclonales. Rendía así un homenaje a su descubridor, César Milstein, nacido en esa fecha en la ciudad costera de Bahía Blanca en Argentina, en el año 1927. Tal como se indicaba en la web argentina, "El premio Nobel de Medicina, César Milstein, es recordado hoy por el gigante de internet Google, al cumplirse 83 años de su nacimiento... Un pequeño homenaje para un cerebro nacional".

Coincidiendo con esa efemérides, en la III Mostra de Cine científico en el Domus (A Coruña) y en la Universidad de Vigo se presentó una interesante película documental titulada *Un fueguito: la historia de César Milstein*, realizada por la cineasta Ana Fraile, sobrina-nieta del científico argentino-británico. Tanto la directora de la película, como Celia Prilleltensky, viuda del Dr. Milstein, estuvieron en Galicia para la presentación de los actos. La película, de 70 minutos de duración, declarada en Argentina de interés nacional por distintas instituciones, recrea la vida y el pensamiento de César Milstein, y supone un sincero homenaje a su fascinante personalidad y a la decisiva importancia de su hallazgo. La película surge del cariño y el respeto a su figura, pero es fiel a la historia, y se incluyen los momentos convulsos que pasó en Argentina, su posterior acogida en Inglaterra y la evolución personal y científica, recogida a través de sus propias palabras, imágenes y opiniones de colaboradores, estudiantes y amigos. El título de la película, *Un fueguito*, surge de la propia directora. En sus propias palabras: "La película sería un homenaje a un hombre que ha encendido miles de fueguitos a lo largo de su vida. Esta película es un fueguito en su nombre" (fig. 1).



**Figura 1 - Logo en Google y cartel de la película *Un fueguito: la historia de César Milstein*.**

Por estas fechas, transcurridos 35 años desde la publicación el 7 de agosto de 1975 en la revista *Nature* del artículo "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" de G. Köhler y C. Milstein, el cual les valdría el Premio Nobel de Medicina y/o Fisiología 9 años más tarde (en 1984), es quizás el momento de repasar en nuestra revista la vida y la ejemplar contribución del investigador argentino-británico, cuyo descubrimiento cambió para siempre la inmunología y la investigación biomédica, disciplinas que, gracias a la poderosa técnica de los anticuerpos monoclonales, habrían de conocer una nueva y fructífera era en el último cuarto del siglo XX.

Hijo de un emigrante judío que abandonó la Europa de principios del siglo XX para huir de la dura vida como soldado en su Ucrania natal, César Milstein nació en Bahía Blanca (Argentina) en 1927. Estudió ciencias químicas en la Universidad de Buenos Aires, en cuyas aulas conoció a la que sería su inseparable compañera de por vida, Celia Prilleltensky, hija asimismo de emigrantes ucranios.

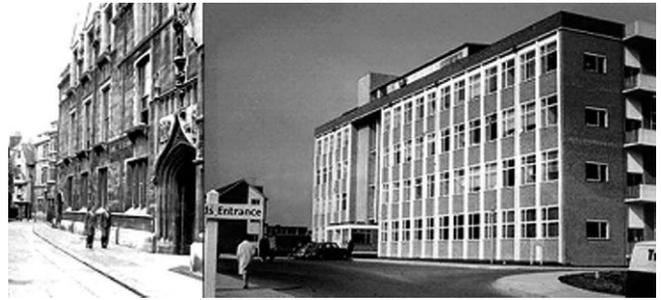
Realizó una primera tesis doctoral con el Dr. Andrés Stoppani en estudios cinéticos de la enzima aldehído deshidrogenasa en el Departamento de Química Biológica, que compaginó con un trabajo en el Laboratorio de Bioquímica Clínica. Recibió una beca del British Council para incorporarse al Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, donde realizó un segundo doctorado supervisado por el Dr. Malcolm Dixon sobre el centro activo de la fosfoglucomutasa. Allí iniciaría su colaboración con el Dr. Fred Sanger (ya entonces Premio Nobel por elucidar la secuencia de la insulina con la aplicación de un nuevo método para secuenciar proteínas; en 1980 recibiría un segundo Premio Nobel por su método para secuenciar los ácidos nucleicos) en el legendario Laboratorio Cavendish (fig. 2).

En 1961 regresó a Argentina y se hizo cargo de la división de Biología Molecular en el Instituto Malbrán. Sin embargo, en este puesto no había de durar mucho: su compromiso político (ya desarrollado en su etapa universitaria) no superó la situación creada por el golpe militar de 1962 (con la caída del gobierno de Arturo Frondizi), que condujo a la intervención de numerosos organismos públicos y le llevaron a la dimisión en solidaridad con el cesado director del centro. Encontró de nuevo acomodo en su añorada Cambridge, de donde no se habría de mover hasta su fallecimiento en 2002.

De nuevo bajo la tutela de Frederick Sanger, instalado ya en el flamante Laboratorio de Biología Molecular del nuevo edificio que el Medical Research Council (MRC) acababa de construir en las afueras de Cambridge, aceptó encantado la propuesta de su mentor de dedicarse al estudio de los anticuerpos, aquellas raras y fascinantes moléculas cuya estructura (2H + 2L) había sido recientemente establecida gracias a los trabajos de Gerald Edelman y Rodney Porter (que compartirían el Premio Nobel en 1972). Pero las bases estructurales de su espectacular polimorfismo eran prácticamente desconocidas: César Milstein dedicaría a su estudio el resto de su vida científica.

Tras unos años de intentos para descifrar la base estructural del polimorfismo de los anticuerpos, en una época dominada por la discusión uno-o-múltiples genes para las regiones V de los anticuerpos, César decidió que *“protein chemistry alone was not going to get us much further”*. Había que ir más allá de la secuenciación de proteínas de mieloma para alcanzar a comprender el mecanismo que subyace a la diversidad funcional de los anticuerpos. Sin embargo, por el camino quedaron para la ciencia su descubrimiento del péptido señal en las proteínas secretadas —en las cadenas ligeras— y una curiosa y profética premonición —ideada junto a Sidney Brenner— del papel de polimerasas de baja fidelidad en la generación de la diversidad de los anticuerpos.

A principios de la década de 1970 llegaron a su laboratorio las primeras muestras de una nueva estirpe celular (MOPC21), adaptada al cultivo *in vitro* en el Salk Institute por K. Horobata y A. Harris a partir de una línea de mieloma de ratón desarrollada años antes en el National Institute of Health por Michael Potter. Siguiendo su instinto de atacar los problemas desde diversos puntos de vista, César derivó sus estudios al nuevo campo, dominado por la entonces palabra mágica *tissue culture*, en varias direcciones: individualidad de los genes VC del ARNm, fusión celular de varias líneas de mieloma MOP21 con nuevas estirpes de rata (obtenida poco después por Hervé Bazin en



**Figura 2 - El laboratorio Cavendish (izquierda) y el Medical Research Council (MRC) cuando se abrió en 1962 (derecha), cuna y local actual del Laboratorio de Biología Molecular. En él realizaron su trabajo los premios Nobel: F. Sanger (1958 y 1980); M. Perutz y J. Kendrew (1962); J. Watson y F. Crick (1962); A. Klug (1982), C. Milstein y G. Köhler (1984), J. Walker (1997); S. Brenner, R. Horvitz y J. Sulston (2002), y V. Ramakrishnan (2009).**

Bélgica) a fin de determinar la disposición en *cis* de las regiones V y C y el fenómeno de exclusión alélica, diversificación clonal en cultivo y el impacto mutacional en la especificidad de los anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales no existían todavía ni en la imaginación de los inmunólogos más expertos. Invitado a exponer sus hallazgos en un seminario en el Instituto Basel de Inmunología, César conoció a Georges Köhler, que acababa de obtener su PhD en el grupo de Fritz Melchers con un estudio sobre la respuesta inmune a la betagalactosidasa. César comentaría más tarde que había ido a Alemania a presentar unos resultados, y lo mejor que se trajo de allí fue a un estudiante posdoctoral para trabajar con él. Interesado en los nuevos aires que soplaban en Cambridge, George se incorporó al estudio en marcha (iniciado por Dick Cotton y David Secher) de las mutaciones somáticas en células de mieloma en cultivo, y se embarcó de forma premonitoria en un pequeño subproyecto dedicado al estudio de estirpes híbridas de células de mieloma normales y mutantes. Pero los estudios no avanzaron en la dirección deseada: ni las mutaciones afectaban fundamentalmente a lo que se presumía la región de reconocimiento antigénico, ni las inmunoglobulinas mutantes podían analizarse en función de su (desconocida) especificidad (un tema recurrente en todas las proteínas de mieloma). Fue una suerte este desconocimiento: de haber dispuesto entonces de otra línea celular diferente en la que la actividad de anticuerpo pudiese trazarse (MOPC21 resultó particularmente estable), es posible que no se hubiese producido el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales.

Obligados por la realidad (*since we could not get a cell line doing what we wanted, we were forced to construct it*), se gesta la idea que había de conducir al descubrimiento de los anticuerpos monoclonales. Puesto que los experimentos de fusión entre líneas de mieloma diferentes indicaban la codominancia de diferentes estructuras VC, ¿por qué no introducir por fusión celular en una línea de mieloma el componente genético de un linfocito convencional (obtenido de un animal inmunizado) que produjese una inmunoglobulina de especificidad conocida, inmortalizando de este modo la secreción de un

anticuerpo específico por la célula híbrida —“hibridoma”— correspondiente?

Se realizó la fusión (llevada a cabo por Georges con la ayuda técnica de Shirley Howe) con células de bazo de un ratón inmunizado con hematíes de carnero (un fuerte inmunógeno muy empleado en aquellos tiempos; la actividad de los anticuerpos producidos se podía seguir fácilmente por lisis de los hematíes asistida por complemento) con un clon derivado del original MOPC21, P3-X63Ag8 (resistente a 8-azaguanina y obtenido previamente por Dick Cotton y Shirley Howe para desarrollar sus estudios de fusión mieloma-mieloma). El primer experimento fue un éxito, obtuyéndose tres clones híbridos productores de anticuerpos antihematíes. El trabajo se publicó en el mes de agosto de 1975 en la revista *Nature* y produjo un gran impacto inmediato en la comunidad científica (fig. 3).

Los propios autores fueron cautos al anunciar el interés potencial de los anticuerpos monoclonales. El famoso trabajo termina con la sencilla frase: “Such cultures could be valuable for medical and industrial use”. De hecho, el vital descubrimiento sólo ocupa la segunda parte del manuscrito, dedicándose la primera a observar la exclusión alélica tras la fusión de dos sublíneas de mieloma de ratón. Poco antes del regreso de Köhler a Basilea (sólo un año después del trabajo en *Nature*), las fusiones planeadas dejaron de funcionar (quizá debido a la toxicidad del agente — virus Sendai— inicialmente empleado como inductor de la fusión, quizá por una mala preparación del medio HAT). Giovanni Galfré se incorporó en aquellos momentos al laboratorio y ensayó varias modificaciones del

método hasta adaptar el polietilenglicol (empleado hasta entonces en otros procesos de fusión en genética de células somáticas) como agente de fusión para la producción de hibridomas, dando forma definitiva a la técnica tal y como la conocemos hoy (fig. 4).

La técnica de obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales nunca se patentó (una suerte para la comunidad científica, que pudo explotar libremente su enorme potencial). Georges Köhler se opuso enérgicamente a la posibilidad de patentar el descubrimiento, mientras César Milstein dejó la decisión a las autoridades del centro: el porqué la patente no se solicitó, forma parte de una curiosa historia, narrada con humor inglés por el propio César en la película aquí reseñada. En un escrito al que Mike Clark tuvo acceso en su etapa doctoral con César (<http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mab25yrs/index.html>), se indica claramente que la institución no veía el potencial comercial del producto: “It is certainly difficult for us to identify any immediate practical applications which could be pursued as a commercial venture, even assuming that publication had not already occurred”.

La aportación que realizaron César Milstein y Georges Köhler sobrepasa los ámbitos de la inmunología, y abarca otras muchas áreas científicas. El propio desarrollo de nuestra especialidad durante las últimas décadas sería inimaginable sin la existencia de los anticuerpos monoclonales. Su repercusión directa en otros ámbitos científicos se ha puesto de manifiesto en la cantidad de caminos que ha abierto, y en estos últimos años ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas y equipos, el avance en el conocimiento de agentes infecciosos, en el diagnóstico de enfermedades y, más recientemente, en su entrada como agente terapéutico.

César Milstein continuó trabajando en su viejo sueño, entender la diversidad de los anticuerpos, aplicando ahora la poderosa técnica que él mismo ayudó a desarrollar. La maduración de la afinidad de los anticuerpos, el mecanismo de hipermutación somática y tantos otros aspectos de la biología de los linfocitos B, fueron los temas a los que contribuyó de forma destacada en las últimas décadas del siglo XX. Tampoco olvidó los aspectos prácticos de su descubrimiento y, en conjunción con Greg Winter, diseñó la transformación genética de los iniciales AcMcs de ratón en secuencias humanas, lo que abrió la puerta a la fuerte implantación de los nuevos anticuerpos en el tratamiento de diversas enfermedades. Pero

*Nature* Vol. 256 August 7 1975

### Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

THE manufacture of predefined specific antibodies by means of permanent tissue culture cell lines is of general interest. There are at present a considerable number of permanent cultures of myeloma cells<sup>1,2</sup> and screening procedures have been used to reveal antibody activity in some of them. This, however, is not a satisfactory source of monoclonal antibodies of predefined specificity. We describe here the derivation of a number of tissue culture cell lines which secrete anti-sheep red blood cell (SRBC) antibodies. The cell lines are made by fusion of a mouse myeloma and mouse spleen cells from an immunised donor. To understand the expression and interactions of the Ig chains from the parental lines, fusion experiments between two known mouse myeloma lines were carried out.

Each immunoglobulin chain results from the integrated expression of one of several *V* and *C* genes coding respectively for its variable and constant sections. Each cell expresses only one of the two possible alleles (allelic exclusion; reviewed in ref. 3). When two antibody-producing cells are fused, the products of both parental lines are expressed<sup>4,5</sup>, and although the light and heavy chains of both parental lines are randomly joined, no evidence of scrambling of *V* and *C* sections is observed<sup>6</sup>. These results, obtained in an heterologous system involving cells of rat and mouse origin, have now been confirmed by fusing two myeloma cells of the same mouse strain,

Figura 3 - Artículo gratuito de *Journal of Immunology*, reimpresso con el permiso de *Nature*. 1975;256:495-7.



Figura 4 - Microfotografía del primer hibridoma obtenido, reconocible por el halo de lisis producido por el anticuerpo monoclonal antihematíes. César Milstein y Georges Köhler el día que recibieron el Premio Nobel de Fisiología y/o Medicina en 1984.

siempre tuvo muy claro el origen de su descubrimiento: *“The hybridoma technology was a by-product of basic research. Its success in practical applications is to large extent the result of unexpected and unpredictable properties of the method. It thus represents another clear-cut example of the enormous practical impact of an investment in research which might not have been considered commercially worthwhile, or of immediate medical relevance. It resulted from esoteric speculations, for curiosity’s sake, only motivated by a desire to understand nature”*. Imposible decirlo más alto y más claro.

Los últimos años de su vida, afectados por frecuentes fallos cardíacos, fue todavía una época de gran producción

científica. Al retirarse formalmente de su puesto de director de la Division of Protein and Nucleic Acids (PNAC) del MRC, por cumplir en 1995 la edad reglamentaria, continuó trabajando con el mismo entusiasmo en un pequeño laboratorio y con un reducido grupo de colaboradores. Ese mismo año, falleció en Alemania de un ataque al corazón George Köhler, cuando aún no había cumplido los 50 años de edad. El de César se paró definitivamente el 24 de marzo de 2002. Poco antes, cuando el hemodinamista que se aprestaba a realizarle una prueba, le preguntó cuál era su profesión, César le contestó: *“I dabble a bit in science”*.