

PRONUNCIADOS EN EL ACTO DE
INVESTIDURA DOCTOR "HONORIS CAUSA"
DEL PROFESOR

PETER SWETLY

UNIVERSIDAD DE GRANADA
MCMLXXXIX

DISCURSOS

PRONUNCIADOS EN EL ACTO DE
INVESTIDURA DOCTOR "HONORIS CAUSA"
DEL PROFESOR

PETER SWETLY

UNIVERSIDAD DE GRANADA
MCMLXXXIX

BIBLIOTECA HOSPITAL REAL
GRANADA

Sala: C

Estante: 16

Numero: 112

12

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA

Nº Documento 840286

Nº Copia 861027

DISCURSOS

PRONUNCIADOS EN EL ACTO DE
INVESTIDURA DOCTOR "HONORIS CAUSA"
DEL PROFESOR

PETER SWETLY

UNIVERSIDAD DE GRANADA
MCMLXXXIX



PRESENTACION POR EL PROFESOR
JESUS THOMAS GOMEZ

© UNIVERSIDAD DE GRANADA
DISCURSO DE INVESTIDURA "DOCTOR HONORIS
CAUSA" PROF. PETER SWETLY
Depósito legal: GR/387-1989
Imprime: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada.
Campus Universitario de Cartuja. Granada.

Printed in Spain

Impreso en España

En el dominio de las Ciencias farmacéuticas, la investigación y promoción de nuevos productos han seguido tres caminos bien definidos: 1. Aislamiento, obtención y caracterización de sustancias de actividad farmacológica a expensas de materiales provenientes de tejidos vegetales o animales. 2. Modificación química de moléculas, de propiedades conocidas y desarrolladas previamente, para la consecución adecuada de otras moléculas diferentes pero con aplicaciones y actividades más favorables, y 3. Obtención por vías químicas de síntesis, fisicoquímicas o biológicas, de nuevas moléculas cuyas estructuras no eran conocidas con anterioridad y que además no poseían precedentes en la Naturaleza.¹

Este tercer sistema general ha determinado el gran avance que, en estos últimos decenios, han experimentado las disponibilidades materiales de la Farmacología y Ciencias afines. A ese espectacular progreso ha contribuido ostensiblemente la aplicación de conocimientos científicos de todo orden y las disponibilidades tecnológicas subsiguientes, pero al mismo tiempo ese desarrollo es el resultado de la contribución de numerosos científicos y grupos de trabajo, junto con la determinante aportación de cuantiosos medios económicos.

En relación a las consideraciones precedentes, se ha apreciado ostensiblemente una particular atención de las Universidades, Centros científicos e Industria farmacéutica hacia los avances espectaculares de la Biotecnología y de la Inmunología. Como consecuencia de esta situación de política científica,

se han promocionado variadas líneas de investigación en estos campos y se han procurado, al mismo tiempo, la incorporación de destacadas personalidades científicas a las vertientes aplicativas de sus modernos conocimientos. Un gran objetivo ha sido la concreción de las circunstancias reseñadas precedentemente: la búsqueda y producción de sustancias de aplicación farmacéutica a través de los logros de la Biotecnología.

En los programas de política científica para las Universidades, de los Ministerios de Educación y Ciencia y de Industria y Energía del Estado español, así como en los correspondientes de las regiones autonómicas, al igual que en todas las Instituciones académicas y de investigación de los países desarrollados, la Biotecnología ocupa uno de los campos de atención prioritaria, tal como lo evidencian los apoyos subvencionados a los proyectos de investigación en ese campo.

El concepto de Biotecnología ha sido definido, en 1981, por la Federación Europea de Biotecnología² como “el uso integrado de la Biología, Microbiología e Ingeniería Genética para el desarrollo de la aplicación tecnológica de las capacidades productivas inherentes a los microorganismos y sistemas de células cultivadas”. La Ingeniería Genética se vale, por su parte, de una reprogramación direccional de las células vivas a fin de lograr por su intermedio una aplicación optimizada en calidad y rendimiento de sus productos.

A su vez, el ámbito o dominio de la Biotecnología comprende parcelas científicas muy desarrolladas en el momento actual, tales como las referentes a Bioenergética, Ecología, Medicina, Farmacia, Agricultura, etc. así como los instrumentos científicos y metodológicos que le son propios, relativos a Biología celular, Microbiología, Parasitología, Química (inorgánica, orgánica y física), etc.

La concreción actual de la Biotecnología ha estado precedida de varias etapas de desarrollo científico. En un primitivo periodo, que comprende la segunda mitad del siglo XIX y casi

la primera del XX, se iniciaron métodos instrumentales que habrían de dar lugar, por ejemplo, a la producción masiva de alcoholes, cetonas, ácidos orgánicos, etc. y a la obtención y purificación de medios y materiales. Esta etapa ha recibido históricamente la denominación de “era Pasteur”.³

Un segundo periodo más corto, comprendido entre 1940 y 1960, ha sido el llamado “era de los antibióticos” y durante el mismo, como es bien sabido, se han logrado, a través de cultivos celulares y de variadísimos sistemas tecnológicos, las diversas penicilinas y otros antibióticos, hormonas, vacunas víricas, vitaminas, etc.

Seguidamente, en el breve espacio de tiempo comprendido hasta 1965, se dió lugar al espectacular progreso en la producción de sustancias de aplicaciones industrial, sanitaria, alimenticia, doméstica... estableciéndose así la designada, un tanto enfáticamente, como “era postantibióticos” y que ha precedido a la actual ó “era biotecnológica”. Esta última se inició aproximadamente en 1975 y ha tenido como contenidos científicos fundamentales todos los procedimientos dirigidos al máximo aprovechamiento de las producciones celulares a través de la aplicación de una ingeniería genética enormemente sofisticada. Los logros habidos durante este periodo, algo superior al de un decenio, han significado relevantes hitos en la Historia de la Ciencia, y han suministrado aportaciones tales como anticuerpos monoclonales, insulina humana, interferones de diversos tipos, etc.

Esta sugestiva parcela de la Ciencia resulta ser, a pesar de su corta historia, una de las especialidades más prometedoras y ha dado lugar, como se indicó precedentemente, a una consideración muy significativa por parte de los responsables de los programas educativos y de investigación de todos los países desarrollados.³ Ha de tenerse en cuenta que las aportaciones científicas en este campo están sujetas a una revisión y estructuración renovada en todo instante, de modo que en cada

momento pueden aplicarse las observaciones de Blaise Pascal cuando afirmaba que "... la verdad es un punto tan sutil que nuestros instrumentos científicos resultan demasiado despuntados. Si llegamos a ella la punta se hace roma y se apoya sobre una gran superficie, tanto sobre lo verdadero como sobre lo falso".

Conscientes de la importancia que para la Universidad de Granada, y para el apoyo de todas las iniciativas que se realicen en este orden, puede significar la inaplazable consideración de estos temas científicos, es por lo que el Departamento de Química Física de la Universidad de Granada, en reunión celebrada el 23 de Marzo de 1987, y a sugerencia de quien ahora tiene el honor de realizar estas consideraciones, aprobó el proponer al Profesor Peter Swetly, destacado especialista en el campo de la Biotecnología, como Doctor Honoris causa por la Universidad de Granada, atendiendo así a la razón fundamental de sus reconocidos méritos académicos y científicos y a la debida estimación por parte de los Departamentos de nuestra Universidad, interesados en tan trascendentales temas de actualidad.

El Departamento de Química Física, a través del anterior Departamento de Fisicoquímica Farmacéutica, posee una antigua y sólida vinculación con los temas de investigación del grupo científico de Boehringer Ingelheim, del que depende el Instituto Ernst Boehringer para Investigación farmacológica de Viena, y de cuyo Departamento de Ingeniería Genética es director el Profesor Peter Swetly.

Desde hace años se ha trabajado en nuestro Departamento de Química Física sobre características fisicoquímicas y propiedades de diversa índole de sustancias procedentes de aquel

Centro y de otras derivadas obtenidas en nuestro Departamento (aminas simpatomiméticas, derivados pirimido-pirimidínicos, derivados tropánicos, etc.). Como resultado de esta dedicación se han publicado numerosos trabajos experimentales y teórico-experimentales, se han confeccionado memorias de Tesis de Licenciatura y de Doctorado, se han realizado comunicaciones a Congresos nacionales e internacionales y se han establecido convenios de colaboración científica institucional.

El Profesor Peter Swetly nació⁴ en Viena, en Diciembre de 1939. Siguió sus estudios secundarios de 1949 a 1957, e ingresó en la Universidad de su ciudad natal para iniciar estudios superiores en la especialidad de Química Física. Realizó la Tesis Doctoral con la dirección del Profesor Tuppy en el Instituto de Bioquímica de la Universidad de Viena sobre el tema "Estudios comparativos de una levadura aerobia y de una mutante con déficit respiratorio", efectuando su examen en 1968.

Hizo su oposición a Cátedra de la misma Universidad en 1980, presentando como trabajo de especialidad el titulado "Estudio del mecanismo molecular de la diferenciación eritropoyética".

Desde 1981 es Director del Departamento de Ingeniería Genética del Instituto Ernst Boehringer, cargo que desempeña en la actualidad. En 1985 fue nombrado, además, Director especialista de Biotecnología e Inmunología de Boehringer Ingelheim Zentrale.

Sus temas de investigación han estado incluidos, a lo largo de su vida científica, en el campo de la Biología molecular y más específicamente en el de Bioquímica y Genética de inmunomoduladores e interferones, así como en el desarrollo de proteínas obtenidas a través de ingeniería genética para su utilización como medicamentos.

Su experiencia docente es amplísima, destacando, a más de la impartición de las lecciones del curriculum de su competencia, otras específicas del tipo "Bioquímica de los virus", "Virus tumorales y diferenciación eritropoyética", "Ciclo celular y diferenciación", "Biología molecular de eucariotes", "Biología celular de las diferenciaciones", "Biología molecular de la célula", "Biología y genética de las células eucarites", "Oncogenes", etc.

Ha dirigido numerosas tesis doctorales, entre las que son de destacar las defendidas por especialistas de prestigio como Rastl, Zlatanova, Adolf, Oberhummer, Schwendenwein, Piler, Himmler, etc. y todas ellas referidas a temas de Biotecnología e Inmunología.

La temática de sus conferencias es variada, pero existe un predominio de las relacionadas con Ingeniería Genética. Así, se pueden consignar las que llevan este título como genérico, acompañado de otras tales como los específicos de "aplicación industrial", "aprovechamiento industrial", "desarrollo y posibilidades", "tratamiento y diagnóstico de enfermedades humanas", "aplicaciones en Medicina", "perspectivas", "industria farmacéutica", "investigación farmacológica", "detección de nuevos mecanismos"... También son frecuentes las relativas a "Interferón" en conexión con "regulación de genes", "estructura y acción", "clonación", "virus tumorales", así como las que abordan temas de tan reconocido interés cuales son la "superinducción en células transformadas", "proteínas estructurales de las mitocondrias", "fusión celular" y "análisis de eucariotes", "heterocariotos", "modificaciones del RNA mensajero", etc.

Sus publicaciones han aparecido en las revistas más prestigiosas de la especialidad y comprenden temas de la importancia sugerida por la siguiente recopilación:

- Estudios comparativos, mediante métodos electroforéticos e inmunológicos, de proteínas estructurales de diverso tipo y mitocondrias en *Saccharomices cerevisiae*.^{5, 6, 7, 8}
- Hibridación celular y virus tumorales, superinfección de células permisivas, adsorción y penetración.^{9, 10, 11, 12}
- Enlace y liberación de ARN virus específico por núcleos de células infectadas, transcripciones en células transformadas.^{13, 14}
- Liberación e inducción de síntesis de hemoglobina en células eritroleucémicas como respuesta a interferón.^{15, 16, 17}
- Métodos de inmunofluorescencia para demostración de anticuerpos frente a complejos ADN naturales y entrelazados.¹⁸
- Actividad de poli-(adenosin difosfato ribosa) polimerasa en células eritroleucémicas.^{19,20}
- Inserción de genes virales en células.²¹
- Partículas intracisternales tipo-A.^{22, 23}
- Síntesis de histonas y DNA durante la diferenciación en células Friend.²⁴
- Producción de interferón por linfoblastos estimulados frente a inductores de la diferenciación en células Friend y por hormonas glucocorticoidales.^{25, 26}

Desde la fecha de su habilitación en la Universidad de Viena comienza a restringirse la variedad de su temática investigadora, dirigiéndose especialmente hacia el estudio de interferones. Aún así realiza nuevas aportaciones en cuanto a métodos instrumentales en Ingeniería Genética. En este sentido publica ciertas modificaciones y mejoras sobre métodos de estudio en tecnología celular, como es, por ejemplo, el relativo a diferenciación de células de Friend²⁷ como método que mejora el descrito anteriormente por Yamoto y Furusawa.

A partir de observaciones en células de Friend sujetas a



crecimiento exponencial, se había captado que las síntesis de ADN e histona están acopladas estrechamente. Swetly²⁸ estudia la síntesis de histona en células eritroleucémicas de crecimiento detenido por deficiencia isoleucémica y obtiene además resultados comparativos sobre las velocidades de incorporación de 3-OH-lisina y 3-OH-arginina a la proteína nuclear total y observa la síntesis de ADN en medios celulares deficientes en leucina.

En otro grupo de experiencias²⁹ se ocupa de la relación entre la diferenciación eritropoyética en células eritroleucémicas de Friend y el posible cambio en los niveles de poliaminas tales como putrescina, espermidina y espermina. Se había propuesto con anterioridad un papel específico en el control del crecimiento celular, ya que se relacionó la actividad enzimática responsable de la síntesis de poliaminas con la velocidad de proliferación celular.

De la misma clase de células aisla núcleos en unidades provenientes de un crecimiento exponencial y en otras que se han inducido a sintetizar hemoglobina, tratando simultáneamente ambas clases con NAD radiactivo bajo condiciones favorables para la síntesis de poli (ADP ribosa).³⁰ Como es sabido, los núcleos de células eucarióticas contienen una enzima, poli (ADP ribosa) polimerasa, que convierte NAD en un homopolímero formado de unidades 2'-(5''-fosforibosil)5'-AMP que está unido covalentemente a histonas y a algunas proteínas nucleares no-histonas. Swetly, mediante metodología electroforética encuentra que tanto en las células control como en las inducidas hay un incremento de la radiactividad total nuclear correspondiente al componente ácido-insoluble en la fracción histona y que la actividad específica permanece inalterada en la proteína no-histona.

En otros análisis sobre la diferenciación celular Friend observa³¹ el efecto inductor de sustancias tipo ácido butírico

sobre la relación de dos subfracciones de histona, en las que se producen cambios reversibles en sus respectivas acetilaciones.

En un grupo de experiencias³² describe las inducciones que sobre la producción de interferón se originan en células linfoides humanas y demuestra que su síntesis en células Namalwa se incrementa marcadamente por cierto número de sustancias de diferente entidad química que afectan la diferenciación celular *in vitro*. Todas las sustancias que estimulan la producción de interferón inhiben la síntesis de ADN. Estas observaciones las hace extensivas a un cierto número de líneas celulares linfoides humanas de diferente origen y características.

Los sobrenadantes de cultivos de ciertas líneas celulares tipo hibridoma secretoras de anticuerpos frente a *Saccharomyces cerevisiae*³³ se han ensayado por incubación con extractos de levadura marcados con ³⁵S, y se han estudiado por movilidad electroforética sobre gel de dodecilsulfato sódico. Se ha descrito así el aislamiento y caracterización de anticuerpos de origen clonal frente a T catalasa, demostrándose además que tales anticuerpos son adecuados para inmunoadsorción de proteínas enlazadas obtenidas a partir de extractos frescos.

Los di-ésteres del alcohol diterpeno, componentes del aceite de croton se han estudiado como promotores de tumores de la piel en el ratón, a través de un mecanismo que, según indica P. Swetly, se debe a que inducen o inhiben la diferenciación celular según los casos. En respuesta al virus Sendai, las células Namalwa sintetizan principalmente interferón tipo leucito pero también una pequeña proporción de interferón tipo fibroplasto. Estas producciones de interferón se pueden incrementar por tratamiento, antes de la adición del virus inductor, con varias sustancias químicas.³⁴

Swetly y cols. emplean el 12-0-tetradecanoil-forbol-13-acetato como promotor tumoral con efectos sobre la proliferación de líneas celulares linfoma y la síntesis de interferón por estas células. Esta sustancia bloquea, a concentraciones nanomolares, la incorporación de timidina en el ADN celular. El derivado 4-0-metil del anterior muestra efectos similares, pero a concentraciones mucho más elevadas. En otra serie de experiencias³⁵ observan que el pretratamiento de las células linfoma con ácido n-butírico, hormonas glucocorticoideas o ésteres de forbol promotores de tumores, originan un incremento muy acusado en la producción de interferón inducido por virus. También observan³⁶ *in vitro* la sensibilidad frente al interferon de células tumorales de mama.

Durante la diferenciación *in vitro* de células de neuroblastoma de ratón, inducidas por n-butirato, dimetilsulfóxido, bisacetamido hexametileno, o por 1,6 dibutiril-adenosina-3'5'-monofosfato, se acumula una proteína básica nuclear con propiedades semejantes a las histonas ricas en lisina.³⁷

P. Swetly y cols.³⁸ ensayan los efectos de diversas sustancias sobre la producción de interferon en un número elevado de líneas celulares hematopoyéticas y tratan de demostrar la existencia de un interferon HuIFN α , en mayor proporción, y de otro HuIFN β . La producción se puede incrementar, según demuestran, por tratamiento de las células con butirato o 5-bromodeoxiuridina, que actúan como inhibidores o inductores de la diferenciación celular.

Se han identificado dos efectos³⁹ diferentes e independientes del butirato sódico sobre la inducción y acción del interferón. El tratamiento simultáneo con interferon y butirato reduce fuertemente la actividad antiviral de la preparación interferónica, mientras que la adición del butirato sódico antes del interferón o después del establecimiento de la actividad antiviral no posee efecto. *In vivo*, el tratamiento alternativo con interferón y butirato, disminuye la incidencia tumoral y prolonga los tiem-

pos de supervivencia en el ratón inoculado con células sarcoma o leucémicas.

P. Swetly y cols.⁴⁰ han descrito la síntesis de un fragmento DNA específico para interferones humanos y su empleo como prueba para el análisis de clones recombinantes conteniendo secuencias de interferón.

La técnica del hibridoma la han empleado⁴¹ para producir anticuerpos monoclonales frente a antígenos asociados a macrófagos. Los anticuerpos monoclonales son utilizados⁴² con el fin de apreciar diferencias antigénicas de macrófagos de rata.

Se ha observado⁴³ el efecto inhibitorio, *in vitro*, del interferón sobre la síntesis de ADN en células cancerosas, con el fin de seleccionar pacientes para un tratamiento postoperatorio con interferón. El método incluye la observación, por microscopía electrónica, de la diferenciación celular originada.

Asimismo ha seguido la heterogeneidad antigénica de macrófagos de rata⁴⁴ y ha comprobado que uno de los anticuerpos monoclonales, llamado anticuerpo V ϵ P6, reacciona con macrófagos alveolares de rata, pero no con macrófagos peritoneales o esplénicos.

Ha examinado un gran número de líneas celulares hematopoyéticas⁴⁵ para producción espontánea de interferones. Los sobrenadantes de cultivos no concentrados de líneas celulares de linfoblastos contienen cantidades elevadas de interferón, más no así las líneas celulares de linfomas, mielomas y leucémicas. También han estudiado la modulación de la producción de interferón espontáneo por sustancias químicas, tales como butirato, dexametasona, dimetilsulfóxido y ésteres del forbol.

También han descrito⁴⁶ el desarrollo de tres líneas celulares hibridoma productoras de anticuerpos frente al interferón α humano (HuIFN- α) y el empleo de estos anticuerpos para

caracterizar, en términos de composición antigénica, el IFN- α producido.

Se ha producido interferón⁴⁷ y se ha realizado su modulación por 5-bromodeoxiuridina, butirato, dexametasona, dimeilsulfóxido y tetradecanoilforbolacetato en diversas líneas celulares hematopoyéticas humanas, a partir de leucemias, linfomas, mielomas y leucocitos normales. El interferón producido se caracterizó parcialmente empleando antisueros específicos para HuIFN- α y HuIFN- β .

Se ha construido⁴⁸ una librería cDNA a partir de células linfoblastoides humanas virus-inducidas y se ha analizado con un oligonucleótido específico para genes interferón. Se han obtenido plásmidos recombinantes conteniendo secuencias de mRNA derivadas a partir de interferones α y β .

Ha podido demostrarse⁴⁹ que el interferón- α -2 recombinante humano controla la excreción de neopterina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además ha sido factible demostrar las bases celulares⁵⁰ de esa liberación *in vivo* como respuesta inmune, y se ha empleado para la comprobación de procesos virales, bacterianos o protozoarios, artritis rematoide, etc. La neopterina, compuesto pirazínico-pirimidínico, derivado del GTP, representa un producto intermediario en la síntesis de biopterina, cofactor esencial en la síntesis de neurotransmisores.

En el contexto de la caracterización de interferones humanos de tipo I en célula Namalwa, después de la inducción por virus Sendai, se ha preparado⁵¹ una librería c-ADN en *E. coli* y se han analizado los clones por hibridación con ADN HuIFN- α 2. Se ha podido demostrar la existencia de dos clones de débil hibridación y que son representativos de una nueva clase de interferones, llamada IFN- ω .

Swetly y cols.⁵² han empleado un sistema de cultivo de órganos de ratones recién nacidos para estudiar los efectos potenciales de IFN- δ sobre los procesos de resorción ósea. El

interferón inmune es un inhibidor eficiente de la síntesis endógena de prostaglandinas, en especial después de la estimulación con trombina o ácido araquidónico, poseyendo un efecto inhibidor semejante a la calcitonina sobre la reabsorción ósea osteoclástica inducida por hormona paratiroidea.

Se han aislado⁵³ fagos recombinantes conteniendo genes para interferón- α , interferón- β e interferón- ω equinos. El análisis de la secuencia y de la hibridación de estos genes revela que el genoma equipo contiene familias génicas de cada una de estas tres clases de interferones tipo I.

Tras la reseña que se ha hecho de las investigaciones del Dr. Swetly, resumida a expensas de sus publicaciones aparecidas hasta 1986, debe indicarse que en estos últimos años ha centrado su atención en las siguientes áreas: Lisozimas, nuevas proteínas (TPA, TNF, OgeBF y VAC), modificadores de proteínas y reguladores genéticos. Especialmente el núcleo de su trabajo ha consistido en el estudio de los interferones δ y ω , así como en el de superóxido-dismutasa (SOD), proteína humana procedente de las mitocondrias, cuya secuencia de ADN ha sido ya establecida y cuya producción y actividad biológica se encuentran en fase de investigación avanzada, a pesar de no haberse establecido aún su perfil biotecnológico completo.

También el Dr. Swetly se ocupa, recientemente, de las denominadas moléculas facilitadoras del "binding" de las inmunoglobulinas. Entre estas son de destacar las que constituyen el denominado "factor epsilon receptor" (FC_εR) del que se han descrito dos tipos, I y II, caracterizados respectivamente por sus afinidades alta y baja por el receptor. La función de referido factor se está tratando de clasificar a nivel de la regulación de la síntesis de Ige.

Finalmente, ha de destacarse su investigación, en colaboración con la Universidad de Limburg, en relación al VAC o "proteína vascular anticoagulante", previsiblemente destinada

a establecerse como candidato para su empleo en sustitución de la heparina por su acción inhibitoria de la formación de factor X_A .^{54, 55, 56, 57, 58}

El análisis del curriculum del Dr: Swetly induce a la observación de que la plenitud de su vida científica se halla comprendida en lo que ha sido el progreso de la Biotecnología.

Las innovaciones que esta moderna especialidad ha aportado al mundo científico vienen a ser, en cierta medida, paralelas a las que el compositor Arnold Schönberg introdujo en el lenguaje musical con su rigurosa y depurada técnica dodecafónica.

No en vano el Dr. Swetly pertenece a una generación de austriacos que allá, al final de los años cincuenta, inició sus estudios universitarios en una ciudad de prestigio, en donde Erwin Schrödinger, se refugió tras su azarosa y productiva vida científica. El carácter intuitivo de la formulación de la mecánica ondulatoria de aquel preclaro vienés, le permitió asimismo expresar su pensamiento, en su doble concepción filosófica y humanística, a través del libro "Mi concepción del mundo" o de su tratado más "biologista" de "¿Qué es la vida?".

BIBLIOGRAFIA

- 1.- "Coloquio sobre Industria Farmacéutica e Investigación". Embajada de Francia en España y Agencia para la Cooperación Técnica Industrial y Económica. Madrid, 5 de Marzo de 1987 (Asistencia personal).

- 2.- "Biotechnology". Fond der Chemischen Industrie. Karlstrasse 21, Postach 11194. 6000 Frankfurt am Main, 11.
- 3.- Sesión sobre Biotecnología. Boehringer Ingelheim. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Mayo de 1987 (Asistencia personal).
- 4.- Recopilación realizada a partir de la documentación oficial presentada en la solicitud de investidura como "Doctor honoris causa".
- 5.- Tuppy, H., Swetly, P., "Binding of nucleotides to structural protein of wild-type and respiration-deficient yeast mitochondria", *BBA*, 153, 293 (1968).
- 6.- Swetly, P., Tuppy, H., "The presence of an altered "Structural protein" in the petite mutant of *saccharomyces cerevisiae*. In: *Membrane Models and Formation of Biological Membranes* (eds. Bolis, L., Pethica, B.A.) North Holland, p. 286 (1968).
- 7.- Tuppy, H., Swetly, P., Wolff, J., "Structural protein of wild-type (rho+) and respiration deficient (rho-) yeast mitochondria. A comparative study using electrophoretic and immunological methods", *Eur. J. Biochem.*, 5, 339 (1968).
- 8.- Swetly, P., "Vergleichende Untersuchungen über das Strukturprotein der Mitochondrien einer atmenden Hefe und einer atmungsdefizienten Mutante", *Dissertation, Universität Wien*, 1968.
- 9.- Knowles, B. B., Steplewski, Z., Swetly, P., Barbanti, G., Koprowski, H., "Cell hybridization and tumorviruses", *Wistar Symposium Monograph Nr, 9*, p. 37 (1969).
- 10.- Swetly, P., Barbanti, G., Koprowski, H., "Response of SV40-transformed cell lines and cell hybrids to superinfection with SV40 and its DNA", *J. Virol.*, 4, 348 (1969).
- 11.- Barbanti, G., Swetly, P., Koprowski, H., "Superinfection of SV40-transformed permissive cells with SV40", *J. Virol*, 6, 644 (1970).
- 12.- Barbanti, G., Swetly, P., Koprowski, H., "Early events in the

- infection of permissive cells with simian virus 40: Adsorption, penetration and uncoating", *J. Virol*, 6, 78 (1970).
- 13.- Sauermann, G., Swetly, P., "Nuclear columns: Labeling and release of virus specific RNA by nuclei of DNA-virus (SV40) infected cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56, 148 (1973).
 - 14.- Swetly, P., Watanabe, Y., "Cell cycle dependent transcription of SV40 DNA in SV40-transformed cells", *Biochemistry*, 13, 4122 (1974).
 - 15.- Swetly, P., Ostergag, W., "Friend virus release and induction of haemoglobin synthesis in erythroleukemic cells respond differently to interferon", *Nature*, 251, 642 (1974).
 - 16.- Swetly, P., "Induction of interferon and erythropoietic differentiation in cells transformed by Friend virus", *J. Virol.*, 17, 27 (1976).
 - 17.- Swetly, P., Ostertag, W., "Interferon: Action and induction in Friend virus transformed erythroleukemic cells during erythropoietic differentiation", In: *Molecular Base of Malignancy* (eds. Deutsch, E., Thieme) G., p. 80 (1976).
 - 18.- Stingl, G., Meingassner, J. G., Swetly, P., Knapp, W., "An immunofluorescence procedure for the demonstration of antibodies to native, double stranded DNA and of circulatin DNA-anti-DNA complexes", *Clin. Immun. Immunopathol.*, 6, 131 (1976).
 - 19.- Swetly, P., Rastl, E., "Expression of poly (adenosine diphosphate ribose) polymerase activity in erythroleukemic mouse cells during cell cycle and erythropoietic differentiation", *J. Biol. Chem.*, 253, 4333 (1978).
 - 20.- Adolf, G. R., Swetly, P., "Poly(A) polymerase activity during cell cycle and erythropoietic differentiation in erythroleukemic mouse spleen cells", *Biochem. Biophys. Acta* 518, 334 (1978).
 - 21.- Swetly, P., "Insertion of viral genes into cells: what value?". In: *Pathobiology of Viral Disease* (1978).
 - 22.- Krieg, C. J., Ostertag, W., Clauss, U., Pragnell, J. B., Swetly, P., Roesler, G., Weimann, B. J., "Increase of intracisternal A-type particle number during inhibition of C-type by interferon on azidothymidine in Friend cells", *Exp. Cell Research*, 116, 21 (1978).
 - 23.- Ostertag, W., Krieg, C. J., Cole, T., Pragnell, I. B., Swetly, P., Weimann, B. J., Dube, S. K., "Induction of intracisternal A-type particles during Friend cell differentiation", *Exp. Cell. Research*, 116, 31 (1978).
 - 24.- Zlatanova, J., Swetly, P., "Uncoupled synthesis of histones and of DNA during Friend cell differentiation", *Nature*, 276, 276 (1978).
 - 25.- Adolf, G. R., Swetly, P., "Interferon production by human lymphoblastoid cells is stimulated by inducers of Friend cell differentiation", *Virology*, 99, 158-166 (1979).
 - 26.- Adolf, G. R., Swetly, P., "Glucocorticoid hormones inhibit DNA synthesis and enhance interferon production in a human lymphoid cell line", *Nature*, 282, 736-738 (1979).
 - 27.- Furusawa, M., Yamamoto, F., Hashiguchi, M., Swetly, P., Zlatanova, J., "Studies on Friend cell differentiation using a new microinjection technique". In: *In vivo and in vitro erythropoiesis: The Friend system* (ed. Rossi, G. B.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 193-198 (1980).
 - 28.- Zlatanova, J. S., Swetly, P., "Histone synthesis in Friend erythroleukemic cells growth arrested by isoleucine deficiency", *Comptes Rendus de l'Acad. des Sci. Bulg.*, 33, 663-665 (1980).
 - 29.- Zlatanova, J. S., Swetly, P., "Polyamines in murine erythroleukemic cells", *Comptes Rendus de l'Acad. des Sci. Bulg.*, 33, 109-111 (1980).
 - 30.- Zlatanova, J. S., Swetly, P., "Poly ADP-ribosylation of nuclear proteins in differentiating Friends cells", *BBRC*, 92, 1110-1116 (1980).
 - 31.- Zlatanova, J. S., Oberhammer, K., Swetly, P., "Expression of

- histone H1^o during differentiation of erythroleukemic mouse cells". In: *In vivo and in vitro erythropoiesis: The Friend system* (ed. Rossi, G. B.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 297-307 (1980).
- 32.- Adolf, G. R., Swetly, P., "Modulation of proliferation and interferon synthesis of human lymphoid cells by inducers of Friend cell differentiation". In: *In vivo and in vitro erythropoiesis: The Friend system* (ed. Rossi, G. B.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 557-584 (1980).
- 33.- Adolf, G. R., Hartter, E., Ruis, H., Swetly, P., "Monoclonal antibodies to yeast catalase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *95*, 350-359 (1980).
- 34.- Adolf, G. R., Swetly, P., "Tumor promoting phorbol esters inhibit DNA synthesis and enhance virus-induced interferon production in a human lymphoma cell line", *J. Gen. Virol.*, *51*, 61-67 (1980).
- 35.- Adolf, G. R., Swetly, P., Ludwig, H., "Tumour promoting compound (TPA) enhances interferon production in chronic lymphatic leukemia cells", *Brit. J. Haematology*, *48*, 343-345 (1981).
- 36.- Kolb, R., Reiner, G., Jakesz, R., Kerjaschki, D., Swetly, P., "In vitro Testung der Interferon-Sensivität von Mammakarzinomzellen", *Langenbeck's Archiv für Chirurgie, Chirurgischer Forum*, Springer Verlag Verlin-Heidelberg-New York 253-345 (1981).
- 37.- Pieler, C., Adolf, G. R., Swetly, P., "Accumulation of histone H1^o during chemically induced differentiation of murine neuroblastoma cells", *Eur. J. Biochem.*, *115*, 329-333 (1981).
- 38.- Adolf, G. R., Bodo, G., Swetly, P., "The human lymphoma cell line NC-37: A alternative source of human lymphoblastoid interferon", *Antiviral Research*, *1*, 275-280 (1981).
- 39.- Adolf, G. R., Swetly, P., "Effects of butyrate on induction an action of interferon", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *103*, 806-812 (1981).
- 40.- Seliger, H., Happ, E., Swetly, P., Rastl, E., "Synthesis of a

- DNA fragment specific for human interferons and its use as a probe for screening recombinant clones containing interferon sequences", *Eur. J. Cell Biol.*, *25*, 8-9 (1981).
- 41.- Rumpold, H., Swetly, P., Boltz, G., Förster, O., "Monoclonal antibodies against macrophage associated antigens". In: *Heterogeneity of Mononuclear Phagocytes*, pp. 47-52 (1981).
- 42.- Förster, O., Rumpold, H., Swetly, P., "Antigenic differences of rat macrophages studies by use of monoclonal antibodies". In: *Mechanisms of Lymphocyte Activation*, pp. 306-308 (1981).
- 43.- Jakesz, R., Kerjaschki, D., Kolb, R., Reiner, G., Spona, J., Swetly, P., "In vitro inhibitory effect of interferon on DNA synthesis of breast cancer cells and relationship to steroid receptors". In: *European Society for Surgical Research*, *13*, 31 (1981).
- 44.- Rumpold, H., Förster, O., Böck, G., Swetly, P., Riedl, M., "Antigenic heterogeneity of rat macrophages. A monoclonal antibody reacting only with alveolar but not with other types of macrophages", *Immunol.*, *45*, 637-643 (1982).
- 45.- Adolf, G. R., Haas, O. A., Fischer, P., Swetly, P., "Spontaneous production of α - and β -Interferon in human lymphoblastoid and lymphoma cell lines", *Arch. Virol.*, *72*, 169-178 (1982).
- 46.- Adolf, G. R., Bodo, G., Swetly, P., "Production of monoclonal antibodies to human IFN- α and their use for analysis of the antigenic composition of various natural interferons", *J. Cell. Physiol. Suppl.* *2*, 61-68 (1982).
- 47.- Adolf, G. R., Swetly, P., "Interferon production in human hematopoietic cell lines: response to chemicals and characterization of interferons", *J. Interferon Res.*, *2*, 261-270 (1982).
- 48.- Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M. B., Swetly, P., "Molecular cloning of human alpha and beta interferon genes from Namalwa cells", *J. Interferon Res.*, *2*, 575-585 (1982).
- 49.- Lang, A., Niederwieser, D., Huber, Ch., Swetly, P., Fuchs, D.,

- Hausen, A., Reibnegger, G., Wachter, H., "Treatment with human recombinant interferon alpha-2 induces increase of in vivo neopterin excretion", *Biochem, and Clinical Aspects of Teridine* (Gruyter W. D., Berlin-New York) 3, 250-254 (1984).
- 50.- Huber, Ch., Batchelor, R., Fuchs, D., Hausen, A., Lang, A., Niederwieser, D., Reibnegger, G., Swetly, P., Troppmair, J., Wachter, H., "Immune response associated production of neopterin: release from macrophages primarily under control of interferon-gamma", *J. Exp. Medicina*, 160, 310-316 (1984).
- 51.- Hauptmann, R., Swetly, P., "A novel class of human type I interferon" *Nucleic Acids Res.*, 13, 4739-4749 (1985).
- 52.- Peterlik, M., Hoffmann, O., Swetly, P., Klaushofer, K., Koller, K., "Recombinant gamma-interferon inhibits prostaglandin mediated and parathyroid hormone-induced bone resorption in cultured neonatal mouse calvaria", *FEBS*, 2, 287-290 (1985).
- 53.- Himmler, A., Hauptmann, R., Adolf, G. R., Swetly, P., "Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Equine Type I Interferons" *DNA*, 5, 345-356 (1986).
- 54.- Himler, A., Hauptmann, R., Adolf, G. R., Swetly, P., "Structure and Expression in *Escherichia coli* of canine interferon- α genes", *J. Interferon Res.* 7, (2), 173-183 (1987).
- 55.- Swetly, P., "La Nuova bioingegneria. Aspetti Pratici nella preparazione dei farmaci: dal laboratorio all'impiego clinico", *Cardiologia* 1987 Librex, Edit: Rovelli, F., 414-418 (1987).
- 56.- Swetly, P., "Industrielle Aspekte des Einsatzes der Gentechnologie". In: *Neue Gentechnologie und Zellbiologie*, Editor: Markl, P., Edition, S., 147-154 (1988).
- 57.- Swetly, P., "System monitoring", 120th International Symposium on the prevention of occupational Accidents and Diseases in the Chemical Industry. *Achema Report* 267-279 (1988).
- 58.- Swetly, P., "The Importance of biotechnology for the discovery of better and safer drugs". In: *Paths to better and safer drugs*, Editor: Martin, Y., Kutter, E., Austel, V. 217-241 (1988).

DISCURSO PRONUNCIADO POR EL PROFESOR
PETER SWETLY

EL ADN RECOMBINANTE Y SU APORTACION AL DISEÑO Y OBTENCION DE NUEVOS Y MAS EFICACES FARMACOS

Granada refleja en su estructura urbana las diferentes culturas que en ella coexistieron y en su apertura a nuevas ideas una vocación universitaria enraizada en los fecundos tiempos de la Madraza. Esta predisposición a la innovación la protagoniza hoy la Facultad de Farmacia al ver en la ingeniería genética uno de los pilares básicos para la obtención de nuevos medicamentos. En mi discurso trataré de demostrarles hasta qué punto las Ciencias farmacéuticas necesitan de la Biología molecular para su desarrollo.

La Ingeniería genética no sólo ha revolucionado el método tradicional de búsqueda de nuevos fármacos, sino también la manera de producirlos. Del screening de miles de sustancias potencialmente activas se ha pasado al estudio a nivel molecular de los procesos patológicos y a producir medicamentos a medida de que son conocidos sus mecanismos de acción.

La Ingeniería genética es fruto de la aparición de nuevas técnicas de investigación desarrolladas en el campo de la Biología molecular, la Genética y la Enzimología, destacándose la técnica del ADN recombinante de entre todas ellas.

Uno de los mayores impactos de la Bioquímica moderna ha sido el descubrimiento de técnicas que permiten la transferencia de ADN de una especie a otra. Este proceso es llamado ADN recombinante o clonación de genes. Normalmente el ADN que forma el gen de un animal superior es insertado en el ADN de una bacteria o una levadura. Como todas las especies utilizan el mismo código para convertir el ADN en proteínas, este proceso resulta en la producción de la proteína del animal superior en una célula microbiana. La consecuencia inmediata de este descubrimiento ha sido un espectacular avance de todas las ramas de la Biología y muy especialmente de aquellas que pretenden esclarecer el comportamiento de las proteínas. La cristalografía de rayos X, por ejemplo, técnica valiosísima para describir la estructura tridimensional de las proteínas, está hoy tan en auge porque gracias al ADN recombinante es posible disponer de cantidades suficientes de la proteína que se desea someter a este tipo de análisis. Otro ejemplo fascinante es el de la mutagénesis dirigida. Esta técnica permite modificar la estructura primaria de una proteína en un sitio determinando cambiando simplemente la secuencia de ADN correspondiente, por lo que se ha convertido en un arma esencial para el estudio de la relación entre la estructura y la función de las enzimas y de muchas otras proteínas.

Aún en el supuesto de que el ADN recombinante sólo sirviera para mejorar nuestro conocimiento de cómo funcionan los sistemas biológicos, no puede olvidarse que este conocimiento es la pieza fundamental para el descubrimiento de nuevos principios terapéuticos. Así como la Bacteriología contribuyó hace un siglo a desenmascarar los agentes causales de las enfermedades infecciosas y de este conocimiento surgieron tratamientos eficientísimos para combatirlos, hoy se espera que la Biología molecular dé con la clave de patologías tan complejas como el cáncer, la autoinmunidad, el reumatismo, la arterioesclerosis, la demencia senil y otras muchas enfermeda-

des. El caso del SIDA es un claro ejemplo de lo que la Biología molecular puede hacer por descubrir la etiología de una enfermedad, la manera de diagnosticarla y su posible tratamiento. Se tardó dos años (1982-1984) en aislar el virus y a partir de ese momento empezó su estudio a nivel molecular. Hoy, a cuatro años de esa fecha, podemos decir que se conoce su ciclo vital, cómo se replica y cómo se integra en el cromosoma de la célula infectada, cuales son los receptores que facilitan su penetración en la célula y el mecanismo que genera su alta variabilidad. Se conoce también su genoma completo (9.749 nucleótidos), se han identificado la mayoría de sus genes (nueve) y las proteínas que éstos codifican y se ha establecido la función de esas proteínas. Todos estos datos son la base para el diseño de las pruebas de diagnóstico, de diferentes vacunas y de terapias específicas: impedir que el virus se replique, eliminar o saturar los receptores, bloquear la síntesis de proteínas virales, etc. Otro buen ejemplo son los oncogenes. Sin la Biología molecular ni siquiera sabríamos de su existencia, a pesar del papel preponderante que juegan en la formación de tumores.

Sin embargo, el ADN recombinante no es una técnica cuya aplicación queda confinada al ámbito de la investigación. El ADN recombinante es también utilizado para la obtención a nivel industrial de proteínas destinadas a usos terapéuticos. En 1989 son ya más de seis las proteínas humanas obtenidas por esta vía que han sido registradas para su uso en Farmacia. Un record, si se piensa que han pasado escasamente diez años desde que se reconociera que en el ADN recombinante yacía un inmeso potencial para producir nuevos fármacos y que la primera empresa dispuesta a explotar este potencial, Genentech, se creara en California.

El ADN recombinante permite producir proteínas iguales a las naturales que servirán para remplazar a aquellas que en el cuerpo humano funcionan deficientemente o para suplementar

a las que éste sintetiza en cantidades insuficientes. La sustitución puede hacerse con una proteína idéntica a la natural o con una proteína mutante, diseñada para mejorar algunas de sus propiedades, por ejemplo su estabilidad. Como la bien planificada arquitectura celular y las especializadas funciones celulares son obra de las proteínas, y como no hay proteína que no pueda ser obtenida por la vía del ADN recombinante, no resulta exagerado concluir que de esta metodología puede surgir a corto plazo en unos casos, a más largo en otros, una terapia para cualquier enfermedad.

La clonación de un gen puede requerir un gran esfuerzo pero el éxito está garantizado. El genoma de cada organismo podríamos visualizarlo como un conjunto de libros, una biblioteca, donde está escrita la información para la construcción y el funcionamiento de ese organismo. En el caso del genoma humano la biblioteca abarcaría 3.000 libros y cada libro tendría 1.000 páginas; cada página a su vez equivaldría a un gen. Un gen es una sucesión ordenada de bases nucleotídicas que especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína y que también contiene las señales necesarias para la regulación de la expresión de esa proteína. En cada célula somática de un organismo hay al menos una copia de toda su genoma.

La metodología básica para construir moléculas de ADN recombinante está esquematizada en la Figura 1. El ADN de la especie donante se corta en determinados puntos con ayuda de las enzimas de restricción. El ADN así tratado queda reducido a un conjunto de fragmentos discretos, uno de los cuales contendrá el gen que se busca. Otra posibilidad es sintetizar enzimáticamente el ADN copiando *in vitro* las moléculas de ARN mensajero del organismo donante, previamente aisladas. Una última posibilidad es sintetizar químicamente el gen de interés partiendo de sus unidades de construcción, los nucleótidos. A continuación, los fragmentos de ADN se unen a otro segmento de ADN : el vector, que procede generalmente de un plásmido y

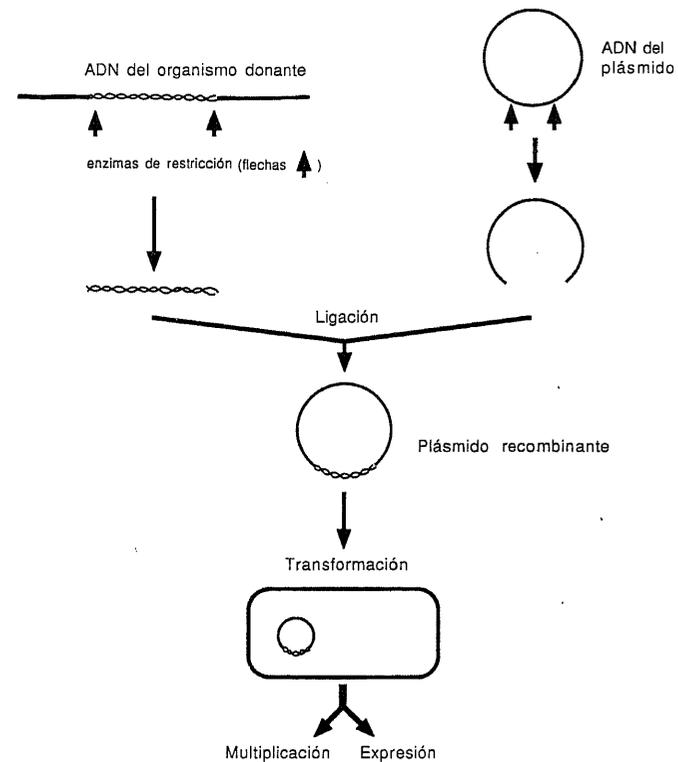


Figura 1.- Clonación de un gen

que es capaz de replicarse en la célula huésped. Así se han formado una serie de moléculas híbridas, recombinantes, que serán introducidas en las células bacterianas por un proceso llamado transformación. En el interior de la bacteria, el plásmido recombinante al replicarse produce miles de copias del ADN del organismo donante.

La producción de una proteína humana en una célula microbiana dirigida por la secuencia de ADN clonada en el

plásmido recombinante, se consigue mediante la adición de secuencias reguladoras de la expresión genética en el organismo huésped. Estas secuencias son especie-específicas y de ellas depende que la expresión del gen humano quede bajo control de la célula huésped. A veces es posible elegir secuencias reguladoras que responden a estímulos del exterior para activar o reprimir la expresión de nuestro gen y que por tanto permiten al científico controlar mediante cambios de temperatura o de la composición del medio de cultivo la expresión de dicho gen. Encontrar las condiciones idóneas para la expresión de un determinado gen en un determinado huésped es una labor empírica que debe repetirse cada vez que un nuevo gen va a ser expresado en una célula que no es la suya. Mientras que para clonar un gen disponemos de un tipo universal de huésped, la bacteria *Escherichia coli*, para expresar ese mismo gen se nos ofrecen múltiples posibilidades. Huéspedes ya tradicionales empleados para expresar genes hererólogos (no propios, intrusos) son la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las células de mamífero en cultivo CHO (chinese hamster ovary cells; un tipo de fibroblastos). Pero hay muchos otros; cada tipo tiene sus ventajas y sus inconvenientes, su elección se basa en las características del producto codificado por el gen a expresar, en ciertos parámetros elegidos a priori por el investigador y en el resultado de la labor empírica mencionada anteriormente.

La célula huésped no sólo dirige la expresión de la proteína deseada, sino también su destino. Dependiendo de cómo hayamos programado nuestro vector de expresión la proteína, una vez sintetizada, puede permanecer en el citoplasma, ser enviada a algún compartimento intracelular o atravesar la membrana plasmática y la pared celular alcanzando el medio de cultivo. Por lo general, la secreción es preferida a la producción intracelular aunque el rendimiento suele ser más alto en este último caso. Una de las ventajas de la secreción es la facili-

dad con que posteriormente se purificará el producto; otras, la mayor estabilidad y la correcta conformación de las proteínas secretadas. Para que una cadena polipeptídica naciente sea secretada tiene que llevar en su extremo amino una señal que la guíe a través de las membranas del retículo endoplasmático y la haga llegar hasta el espacio intracistérico. A continuación la proteína es empaquetada en vesículas secretoras asociadas al aparato de Golgi y liberada al exterior de la célula por exocitosis. Todavía en tránsito por el retículo endoplasmático, enzimas proteolíticas específicas separan el péptido señal del resto de la proteína que de este modo será secretada en su forma madura (nativa).

El cultivo de un organismo recombinante, bacteria, levadura o célula animal, se ajusta a modelos convencionales. Sin embargo, los factores a tener en cuenta a la hora de la producción industrial de una proteína recombinante ya no son convencionales. Dada su complejidad las proteínas no son un producto de fermentación fácil y los organismos recombinantes imponen también sus restricciones. Los fermentadores, por ejemplo, deben ser diseñados de manera que se cumplan las normas internacionales de seguridad adoptadas para confinar las especies recombinantes a un determinado recinto ("contención biológica").

Elegir el huésped y la cepa adecuados es una decisión importantísima. La tendencia, sobre todo si se trata de bacterias o levaduras, es utilizar cepas en las que uno de los genes que codifica un metabolito esencial ha sido mutado de forma que ese gen ha dejado de funcionar. Este truco potencia las posibilidades de incrementar el rendimiento optimando el medio de cultivo y puede ayudar a estabilizar los plásmidos en el interior de la célula huésped. Los plásmidos de levadura dependen de este tipo de presión selectiva para no ser expulsados de la célula, ya que el plásmido contiene el gen cuya actividad ha sido destruida en la cepa que lo alberga. Los plásmidos

de bacteria, por el contrario, llevan genes que confieren resistencia a los antibióticos y la presión selectiva se ejerce añadiendo un determinado antibiótico al medio de cultivo. También es importante controlar la estabilidad del plásmido durante la fermentación, puesto que ningún producto será obtenido si el plásmido conteniendo la información que codifica la proteína humana que queremos fabricar es rechazado por el huésped durante su crecimiento.

Muchas de las proteínas recombinantes sintetizadas en *E. coli* poseen una metionina adicional correspondiente al triplete iniciador de la cadena polipeptídica. *E. coli* tiene enzimas capaces de separar esta metionina del resto de la molécula. Optimando cuidadosamente la fermentación puede reducirse el contenido en metionina inicial de la proteína recombinante a niveles indetectables.

Otro punto decisivo en la producción industrial de una proteína es su extracción y aislamiento de la masa celular o del medio en el que se encuentra, así como su posterior purificación. La tarea es compleja y no es extrapolable. Cada proteína tiene una curva de solubilidad diferente y su estabilidad es también diferente, lo que inevitablemente significa que cada proteína requiere la elaboración de un esquema de purificación propio. Nuestras proteínas también requieren ser purificadas hasta homogeneidad. Muchos de los métodos en que hoy se basa la purificación en gran escala de proteínas eran prácticamente desconocidos antes de que las necesidades de la Ingeniería genética obligara a desarrollarlos.

El primer paso hacia la purificación consiste en la separación de las células por centrifugación o filtración. Las células se rompen mecánicamente o se desechan según el caso y a continuación se somete el extracto celular o el medio de cultivo conteniendo la proteína secretada a distintos tipos de cromatografía. Para nuestros propósitos, la más interesante, útil y eficaz de las cromatografías es la inmuno-cromatografía, técnica que se

basa en la especificidad del enlace antígeno-anticuerpo. En la práctica el anticuerpo se halla inmovilizado en la columna cromatográfica y sólo la proteína deseada (antígeno) quedará retenida a su paso por la columna. El grado de pureza que se alcanza tras varios ciclos de concentración y purificación, suele ser del 99% con respecto al punto de partida. Este logro carece de significado si no va acompañado de la conservación de la actividad biológica de la proteína. Durante la purificación debe evitarse someter a las proteínas a tratamientos drásticos en los que el riesgo de alterar la estructura terciaria de las proteínas, con la correspondiente pérdida de actividad, sea alto.

El riesgo de desnaturalizar la proteína unido al de perder el plásmido obliga no sólo a una minuciosa caracterización del producto final, sino también a llevar un riguroso control de estos dos parámetros durante todo el proceso de producción. La estabilidad del plásmido y el número de copias presentes por célula huésped son determinados tanto en el transcurso, como al final de cada fermentación. El número de plásmido característico de una célula bacteriana oscila entre 20 y 60, llevando cada plásmido una copia de nuestro gen. El número de copias se comprueba por apareamiento del ADN del plásmido previamente aislado, transferido y fijado a un filtro de nitrocelulosa, con una sonda adecuada. La cantidad de proteína que debería ser sintetizada se comprueba de manera parecida pero partiendo del ARNm —en realidad lo que se comprueba es el número de copias de ARNm hechas—.

La calidad del producto final se mide en función de dos valores, pureza y actividad biológica. Establecer un ensayo para valorar la actividad de esta nueva clase de productos farmacéuticos no es tarea fácil ya que las actividades a medir son difíciles de tipificar. El interferón se ensaya midiendo el nivel de protección alcanzado tras inyectar un cultivo celular con un determinado virus. También hay que crear nuevas técnicas

analíticas que se ajusten a las exigencias de estos productos y que permitan detectar niveles mínimos de los posibles contaminantes que figuran en la primera parte de la tabla I. En este sentido la Inmunología aplicada ha mostrado ser un arma potentísima. Anticuerpos monoclonales obtenidos utilizando el agente contaminante como material antigénico son capaces de denunciar la presencia de nanogramos de estas impurezas. La

TABLA 1

Control de pureza de proteínas recombinantes antes de ser usadas en seres humanos

Contaminaciones:

- Acidos nucleicos.
- Contaminaciones por bacterias patógenas procedentes de personas.
- Actividades enzimáticas perjudiciales para el producto o el destinatario (proteasas, etc.).
- Sustancias inmunogénicas que activen la formación de anticuerpos, complemento o linfocitos T.
- Proteínas extrañas procedentes del organismo huésped, el medio de cultivo o las columnas cromatográficas.

Formas modificadas de proteínas:

- Metionina inicial en el extremo amino.
- Aminoácidos fosforilados o glicosilados/glicosilados?
- Formación incorrecta de puentes disulfuro.
- Conformación incorrecta, oligomerización o degradación.
- Presencia de aminoácidos no naturales (incorporación de norleucina en lugar de metionina).

única categoría de contaminantes que se escapa a los métodos inmunológicos son los ácidos nucleicos, por carecer de capacidad antigénica. Para ellos, hay que contar con técnicas que permitan detectar picogramos de ADN. El objetivo es asegurarse de que la cantidad de ADN que contamina una dosis terapéutica de proteína recombinante es estadísticamente inferior a la cantidad de ADN necesaria para codificar un gen.

La caracterización y separación de formas conformacionalmente modificadas, isoformas, de una proteína no deja de ser un desafío a los métodos analíticos convencionales de la Química-física de proteínas. Algunos de estos problemas se hicieron patentes al tratar de encontrar un criterio que permitiera establecer de manera satisfactoria el grado de pureza del interferón humano $\alpha 2$ (IFN $\alpha 2$) recombinante. El IFN $\alpha 2$ es miembro de una familia de proteínas de estructura parecidas y marcada actividad antiviral, los interferones, que despertaron enormes expectativas como agentes terapéuticos y que fueron de las primeras proteínas que se obtuvieron por vía recombinante. La molécula del IFN $\alpha 2$ consta de 165 aminoácidos y su estructura tridimensional viene determinada por la formación de dos puentes disulfuro entre las cuatro cisteínas de su cadena, uno entre la cisteína 1 y la 98 y otro entre la 29 y la 138 (Figura 2). En las células humanas la formación de estos puentes tiene lugar bajo condiciones perfectamente controladas cuando la proteína pasa por el aparato de Golgi camino del exterior. En las células bacterianas la situación es muy diferente ya que en el ambiente sumamente reductor del citoplasma (debido a la presencia masiva de glutatión) las cisteínas no pueden unirse mediante enlaces disulfuro. La consecuencia es que si se usa *E. coli* como organismo huésped para producir IFN $\alpha 2$ la oxidación de las cisteínas no tiene lugar hasta que durante la operación de ruptura de la célula el contenido citoplasmático es vertido en el medio de cultivo. Desgraciadamente, esta oxidación ocurre en unas condiciones mucho menos controladas que

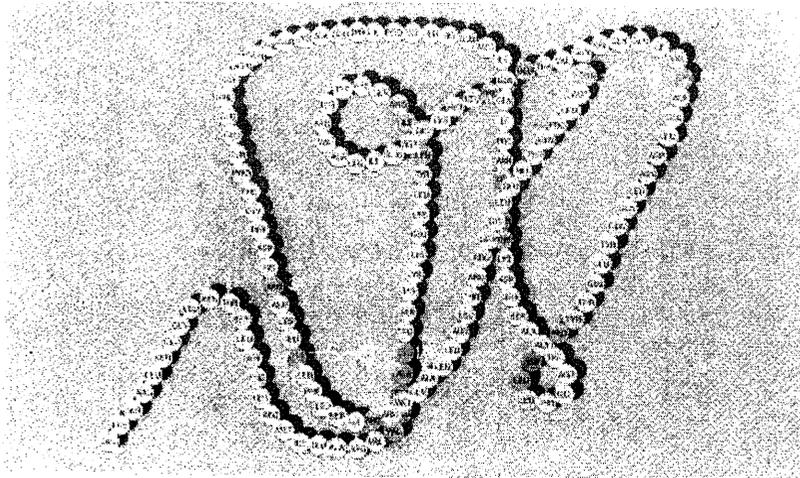


Figura 2.- La molécula de IFN α 2

en el interior de la célula y la formación de los puentes disulfuro no siempre es correcta. De hecho, en una molécula tan pequeña y poco compleja como el IFN α 2 se han encontrado todo tipo de combinaciones aberrantes: la cisteína 1 puede haberse unido a la 29 o a la 138, la 29 a la 98, y la 98 a la 138; también puede darse el caso de que una, varias o todas las cisteínas sigan en estado reducido. Sin embargo, cuando el IFN α 2 recombinante es analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en su modalidad de permeación de gel (Figura 3) se diría que la muestra es homogénea y que su pureza es del 99%. Lo que demuestra que esta técnica, a pesar de su alto poder de resolución sólo sirve para comprobar la ausencia de proteínas de distinto peso molecular, pero no da información alguna sobre la estructura secundaria y terciaria de la molécula. Para detectar formas con estructuras irregulares, lo que hemos dado en llamar isoformas, hay que recurrir a la HPLC en fase reversa. En la figura 4 puede verse el resultado del análisis de la

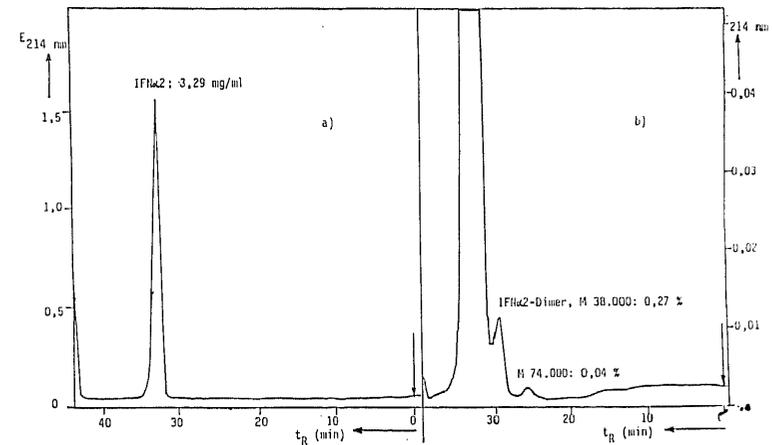


Figura 3.- HPLC de permeación de gel del IFN α 2
Panel *a*: muestra aparentemente homogénea. Panel *b*: la misma muestra analizada en condiciones más sensibles: junto al pico principal (IFN α 2) se observan otros dos picos que corresponden a la forma dímera y tetra-mera y representan el 0.27 y 0.04% del interferón total.

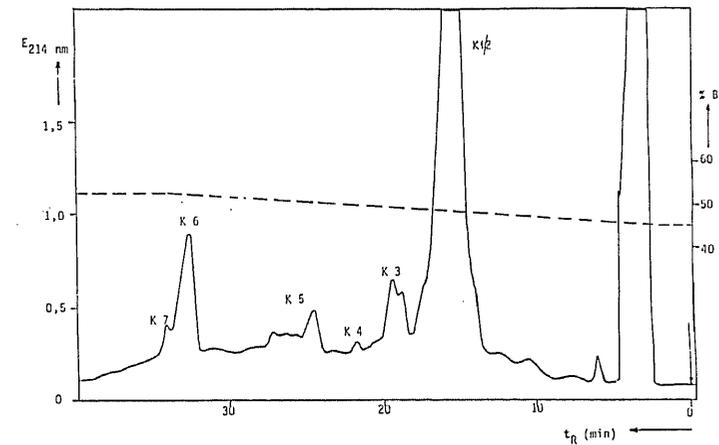


Figura 4.- HPLC de fase reversa del IFN α 2.

misma muestra de $IFN\alpha 2$ que antes parecía homogénea, apreciándose ahora 7 picos. Los picos corresponden a 7 conformaciones diferentes del interferón y su identidad ha sido establecida comparando sus mapas peptídicos y secuenciando los aminoácidos de cada péptido.

La identificación de moléculas isoformas es crucial a la hora del control de calidad de un producto farmacéutico, ya que precisamente en ellos todas las formas con conformación incorrecta deben ser eliminadas. La razón para ello es que estas formas carecen de actividad biológica, pero sin embargo pueden actuar como antígenos contribuyendo a que los pacientes creen anticuerpos contra el producto. Durante los ensayos clínicos realizados con el $IFN\alpha 2$ se ha comprobado que las formas incorrectamente plegadas son mucho más antigénicas que el interferón nativo.

Una proteína que va a ser utilizada como fármaco debe ser administrada bajo forma farmacéutica. La creación de nuevas fórmulas galénicas en las que el principio activo es una proteína tiene necesariamente que ir acompañada de un aumento de los conocimientos actuales de la Química-física de proteínas. Las proteínas son más susceptibles de degradación biológica e inactivación térmica que la mayoría de las sustancias de bajo peso molecular basadas en anillos heterocíclicos. De todos es sabido que las proteínas se degradan rápidamente a temperatura ambiente. Para alargar su vida podría intentarse añadir algún agente estabilizante o conservador de tipo inerte. El problema radica en que no se sabe casi nada sobre el comportamiento de las proteínas en presencia de tales agentes, ni de los mecanismos por los que éstos ayudan a mantener su estabilidad; tampoco se conocen métodos que permitan predecirla. Los métodos que en este sentido parecen más prometedores son el termoanálisis y el discoísmo circular.

En el Ernst Boehringer Institute (EBI) de Viena, en un esfuerzo conjunto y combinando disciplinas tan mutuamente

relacionadas como la Biología celular y molecular, la Inmunología, la Química de proteínas, la Galénica y las fermentaciones industriales, ha sido posible clonar, expresar y desarrollar varias proteínas de origen humano hasta llegar a la fase clínica. Entre ellas se cuentan tres tipos diferentes de interferón: el alfa, el gamma y el omega. El interferón alfa derivado de los leucocitos es muy eficiente para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (leucemias) y algunas infecciones virales, tales como las producidas por los herpes, papilomas y la hepatitis crónica. Una parte muy importante de la investigación clínica encauzada a emplear interferón en el tratamiento de la hepatitis crónica de tipo B, fue llevada a cabo en España, en la madrileña clínica de la Concepción. También en España se están conduciendo ensayos con interferón gamma. En el interferón gamma, derivado de los linfocitos T, se ve un potencial importante para combatir afecciones inmunitarias y muy especialmente la granulomatosis crónica. El tercer tipo de interferón, el omega, está emparentado estructuralmente con el alfa pero no muestra immuno-reactividad con él. Este interferón ayuda a estabilizar el feto en el útero. Otros proyectos no han alcanzado la fase clínica pero se acercan a ella. Uno de ellos se trata de un nuevo agente anticoagulante de tipo vascular (VAC) que actúa a nivel de los fosfolípidos que intervienen en la secuencia de reacciones que conducen a la coagulación de la sangre. El VAC tiene una alta afinidad por los fosfolípidos conjugándose con ellos e impidiendo así la activación de la tromboplastina; la tromboplastina a su vez cataliza la formación de trombina. Otro es la lisozima humana, enzima que juega un papel importante en la defensa contra las infecciones y que es el principal producto de secreción de los macrófagos. La lisozima es una proteína extremadamente pequeña (130 aminoácidos), pero contiene ocho cisteínas y su correcta conformación requiere la formación de 4 puentes disulfuro. Por esta razón el huésped escogido para la producción de lisozima ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras son organismos eucarióticos y en



sus células la síntesis y secreción de proteínas siguen los mismos pasos que en las células animales por lo que la formación de los puentes disulfuro no ofrece problemas.

Las proteínas que son usadas como fármacos no pueden ser administradas por vía oral ya que serían inmediatamente degradadas por las enzimas gastrointestinales. Esto es una seria limitación que tal vez la Galénica pueda resolver un día. Mientras tanto se está ya pensando en desarrollar una segunda generación de fármacos basados en la Biotecnología. Estas sustancias no son proteínas sino productos de bajo peso molecular que interactúan con ellas. En este caso se trataría de identificar la causa de un proceso patológico y valiéndose de nuevo de la Biología molecular encontrar la manera de interferir en el proceso. Posteriormente se diseñan o se buscan productos, agonistas o antagonistas, que cumplan esta función. El siguiente ejemplo sirve para ilustrar este concepto. Uno de los laboratorios de EBI se dedica a estudiar la estructura de un grupo de virus llamados rinovirus, implicados en el resfriado común. Gracias a la clonación del RNA del virus pudo conocerse la secuencia completa del genoma viral (algo más de 7000 nucleótidos). Un gen de este virus codifica una proteína con actividad proteolítica que es imprescindible para la maduración del virus. Esta enzima, tanto por su estructura como por su función es totalmente diferente de las proteasas humanas conocidas hasta ahora. Resulta evidente que si encontrásemos un inhibidor específico de esta proteasa sería posible bloquear específicamente el proceso de infección sin interferir con otras funciones celulares. Pero para embarcarnos en un programa de screening necesitamos disponer de grandes cantidades de proteasa, cosa que sería imposible si no hubiéramos antes clonado el virus. Otro objetivo ha sido la caracterización del centro activo de la proteasa. Con el gen en la mano y la técnica de la mutagénesis dirigida no ha resultado difícil el conseguirlo. Conociendo qué aminoácidos participan en el centro activo de

la proteasa esperamos diseñar compuestos químicos que se conjuguen con el mismo y lo inutilicen, impidiendo así la maduración del virus.

En esta categoría de fármacos caen también productos que modifiquen los receptores, para lo cual es imprescindible haber clonado el receptor. A modo de ejemplo citaré el receptor de la inmunoglobulina E (FceR). La inmunoglobulina E (IgE) es uno de los factores desencadenantes de las reacciones alérgicas. La inmunoglobulina E actúa uniéndose a su receptor, localizado en la superficie de los leucocitos basófilos de la sangre y los mastocitos de los tejidos, y provocando una descarga de histamina y otras aminas biológicamente activas. Por tanto, si evitamos esta primera unión la reacción alérgica no tendrá lugar. También en EBI y en colaboración con un grupo japonés de la Universidad de Oxaka se han clonado este receptor y se están buscando drogas que lo bloqueen.

Estos ejemplos indican claramente que para el diseño de los fármacos se necesita en una fase u otra de la Biología molecular. El objetivo puede ser obtener un producto terapéutico *per se*, o puede ser identificar los componentes celulares que participan en un proceso patológico. Este último objetivo es muy importante para racionalizar el diseño de mejores fármacos, o sea más específicos y más seguros.

