3977

B 616
1999

53L

CORFO - FONTEC

PROYECTO 98-1392

PRODUCCION DE HEMOCIANINA DE LOCO (*Concholepas concholepas*) PARA SER UTILIZADA COMO TRANSPORTADOR PARA PRODUCIR ANTICUERPOS

INFORME FINAL

Agosto 1999

BIOSONDA S.A.®
BIOTECNOLOGIA

Edo. Castillo Velasco 2902 Fono: 209-6770 Fax: 274-5462
E-mail:biosonda@ctc-mundo.net
SANTIAGO – CHILE

616.0798
B 616
1999

PRESENTACIÓN

En el último decenio, se constata que el país ha sabido enfrentar con éxito el desafío impuesto por la política de apertura en los mercados internacionales, alcanzando un crecimiento y desarrollo económico sustentable, con un sector empresarial dinámico, innovador y capaz de adaptarse rápidamente a las señales del mercado.

Sin embargo, nuestra estrategia de desarrollo, fundada en el mayor esfuerzo exportador y en un esquema que principalmente hace uso de las ventajas comparativas que dan los recursos naturales y la abundancia relativa de la mano de obra, tenderá a agotarse rápidamente como consecuencia del propio progreso nacional. Por consiguiente, resulta determinante afrontar una segunda fase exportadora que debe estar caracterizada por la incorporación de un mayor valor agregado de inteligencia, conocimientos y tecnologías a nuestros productos, a fin de hacerlos más competitivos.

Para abordar el proceso de modernización y reconversión de la estructura productiva del país, reviste vital importancia el papel que cumplen las innovaciones tecnológicas. toda vez que ellas confieren sustentación real a la competitividad de nuestra oferta exportable. Para ello, el Gobierno ofrece instrumentos financieros que promueven e incentivan la innovación y el desarrollo tecnológico de las empresas productoras de bienes y servicios.

El Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Productivo FONTEC, organismo creado por CORFO, cuenta con los recursos necesarios para financiar Proyectos de Innovación Tecnológica, formulados por las empresas del sector privado nacional para la introducción o adaptación y desarrollo de productos, procesos o de equipos.

Las Líneas de financiamiento de este Fondo incluyen, además, el apoyo a la ejecución de proyectos de Inversión en Infraestructura Tecnológica y de Centros de Transferencia Tecnológica a objeto que las empresas dispongan de sus propias instalaciones de control de calidad y de investigación y desarrollo de nuevos productos o procesos.

De este modo se tiende a la incorporación del concepto "Empresa - País", en la comunidad nacional, donde no es sólo una empresa aislada la que compite con productos de calidad, sino que es la "Marca - País" la que se hace presente en los mercados internacionales.

El Proyecto que se presenta, constituye un valioso aporte al cumplimiento de los objetivos y metas anteriormente comentados.

FONTEC - CORFO

INDICE

		Página
ABREVIACIONES		2
1.	RESUMEN EJECUTIVO	3
2.	EXPOSICION DEL PROBLEMA	14
3.	OBJETIVOS TECNICOS	27
4.	METODOLOGIA GENERAL	28
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	32
6.	CONCLUSIONES	44
7.	IMPLEMENTACION DE LOS RESULTADOS	45
8.	BIBLIOGRAFIA	46
9.	ANEXO 1	52
	Publicaciones en Revistas y Periódicos Locales sobre la exportación de hemocianina de loco	

ABREVIACIONES

AMC	Anticuerpo monoclonal
BSA	Albúmina de suero de bovino
CCH	Hemocianina de loco (*Concholepas concholepas*)
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
Epítopo	Sitio del antígeno al cual se une un anticuerpo
IgG	Inmunoglobulina de la clase G
IgM	Inmunoglobulina de la clase M
KLH	Hemocianina de lapa (Keyhole Limpet Haemocyanin) de *Megathura crenulata*
LAL	Lisado de Amebocitos de *Limulus*, método para determinar la presencia de LPS
LPS	Lipopolisacárido de la pared bacteriana, indicador de la contaminación de la preparación con microrganismos
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de Amonio
PBS	Amortiguador fosfato salino
pH	Grado de acidez de una solución
RIA	Radioinmunoanálisis

1. RESUMEN EJECUTIVO

1.1 Antecedentes de la Empresa

Biosonda S.A., es una empresa de Biotecnología, creada en Septiembre de 1992 por científicos chilenos para realizar investigación, desarrollo, producción y comercialización de productos y procesos que involucran métodos biotecnológicos modernos, especialmente en el campo de la inmunobiotecnología.

La empresa está organizada en 4 áreas estratégicas, cuyas funciones y logros se describen a continuación.

AREA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

En el Area de Investigación y Desarrollo, Biosonda S.A., ha colocado en el mercado un producto denominado ***"Blue Carrier"***, el cual se comercializa internacionalmente, directamente por la empresa y a través de dos de los más prestigiados catálogos de productos para Investigación en el campo de la inmunología, como son las firmas noreteamericanas Pierce Chemical Company y Calbiochem Novabiogen.

El producto *Blue Carrier* se elabora en base a la proteína hemocianina, que se extrae de una especie de molusco que existe sólo en Chile denominado Loco (*Concholepas concholepas).* Esta proteína tiene amplio uso en el campo de la inmunología básica, como proteína transportadora en el estudio de la respuesta inmune humoral contra moléculas pequeñas (haptenos) y también, en el campo aplicado, para producir antisueros

convencionales y anticuerpos monoclonales. Actualmente también, se está aplicando con éxito en la terapia del cáncer de vejiga en humanos.

Además, actualmente también, el equipo de científicos de Biosonda S.A., con el apoyo financiero de **FONTEC** y **FONDECYT,** se encuentra trabajado en el desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (tipo ELISA), en base a anticuerpos monoclonales contra **Histamina y Mollerosina**, aminas biogénicas presentes en harina de pescado, identificadas como agentes causales de la enfermedad conocida como **Vómito negro** que afecta a pollos Broiler.

Los inmunoensayos cuantitativos para cuantificar Mollerosina e Histamina en harina de pescado, representan una importante innovación tecnológica en el área de control de las harinas de pescado y también, permitirán mejorar el proceso productivo mismo, logrando así aumentar la competitividad y liderazgo en las ventas de harinas producidas en nuestro país.

Se debe destacar además que Biosonda S.A., está realizando una importante labor de capacitación de jóvenes científicos y biotecnólogos de distintas universidades del país, quienes han realizado sus tesis de grado en el marco de los proyectos de investigación biotecnológica de la empresa.

AREA DE ASESORIAS EN BIOTECNOLOGIA

En el Area de Asesorías, la empresa cuenta con un selecto grupo de clientes, la mayor parte de ellos científicos de prestigiadas universidades del país, quienes requieren para sus investigaciones identificar y caracterizar proteínas de su interés mediante anticuerpos específicos.

Biosonda S.A., también se presta asesoría a empresas, entre las que se destaca **INUAL Ltda**., líder en el campo de la industria de alimentos para la crianza de animales y peces.

AREA DE SERVICIOS Y COMERCIALIZACION

Biosonda S.A., dispone de un área comercial con personal altamente capacitado que ofrece sus servicios y productos con apoyo de sistemas informáticos. Básicamente, la empresa utiliza para promociones y para un intercambio activo con los clientes, sus dos correos electrónicos (**biosonda@ctc-mundo.net** y **biosonda@cepri.cl**). Además, recientemente, con el apoyo del Programa **CEPRI** asociado a **CORFO**, la empresa a puesto al servicio de la comunidad su página web (**w.w.w.cepri.cl/biosonda**).

En el Area de Servicios, Biosonda S.A., ha puesto a disposición de la comunidad científica y empresarial, su vasta experiencia en la caracterización de antígenos mediante el desarrollo y producción a pedido, de anticuerpos policlonales en conejos y anticuerpos monoclonales murinos, siendo la única empresa en Chile que dispone de colonias de ratones de las cepas BALB/c, C3H/He y C57BL/6. En estos animales, pueden crecer líneas tumorales e hibridomas histocompatibles, obteniéndose anticuerpos monoclonales en la forma de líquidos ascíticos de alta pureza. De esta forma, la empresa pone a disposición de la comunidad científica y profesional del país, animales de experimentación de óptima calidad y composición genética.

En el Área de Comercialización, Biosonda S.A., ha tomado la representación exclusiva de la firma **Pierce Chemical Company** de U.S.A, líder mundial en el desarrollo de reactivos para investigación básica y aplicada en el campo de la inmunoquímica y química de proteínas. Complementando esta línea, la empresa está importando en forma rápida y a precios competitivos productos de la empresa **Sigma Chemical Co.,** y **Aldrich** de U.S.A., de fuerte demanda local.

También Biosonda S. A., tiene la representación oficial de la empresa alemana **r-Biopharm**, líder en el desarrollo de inmunoensayos para el control de calidad de alimentos. Además, Biosonda S.A., tiene las representaciones de **Biosource,** U.S.A, y de **Santa Cruz Biotecnology, USA.,** quienes producen reactivos de alta calidad para el diagnóstico clínico por citofluorometría de flujo, inmunohistoquímica y ensayos de ELISA para la cuantificación de citoquinas en el campo de la Inmunología.

El conjunto de representaciones en el campo de los anticuerpos monoclonales y policlonales, colocan a nuestra empresa en un lugar de liderazgo al poner a disposición de la comunidad científica y tecnológica del país. una cobertura casi total en insumos, sondas y Kits para inmunodetección y productos para biología molecular.

En el área de cultivo celular, Biosonda S.A., importa líneas celulares desde la **ATCC**, USA y representa en forma exclusiva la firma **HyClone** de USA, la más prestigiada a nivel mundial en el campo de la producción de sueros fetales de bovino y medios de cultivo. Además representa las firmas **Iwaki Glass Co.**, Japón y **Greiner** de Alemania, quienes producen material plástico e insumos para el cultivo de líneas celulares.

Entre los servicios más exitosos que ofrece Biosonda S.A., se encuentra la síntesis de oligonucleótidos, a través de un convenio exclusivo con la firma **Keystone** de USA. División de Biosource. Mediante este servicio, Biosonda S.A., entrega a los usuarios sus pedidos de oligonucleótidos en un tiempo récord de 5 días hábiles a los precios más bajos del mercado. Asimismo, se está ofreciendo el servicio de secuenciación de DNA a través de la firma **BiotechCore** de USA.

AREA DE ADMINISTRACION

La empresa está organizada en base a una Gerencia General que ejecuta las políticas de desarrollo de la empresa determinadas por su directorio y, para llevar adelante todos los controles de sus aspectos financieros, está apoyada por un departamento de contabilidad.

1.1.1 Instalaciones

Las oficinas de Biosonda S.A. están ubicadas en Eduardo Castillo Velasco 2902. Las instalaciones que abarcan alrededor de 200m^2 construidos, incluyen sala de reuniones, biblioteca, bodega y oficinas comerciales dotadas de sistemas de informática y comunicación digital.

Además, la empresa posee un Laboratorio de Investigación y Desarrollo de aproximadamente 20 m^2 dotado de los equipos básicos para desarrollar todas las técnicas básicas de inmunoquímica. Además posee una sala de cultivo de células que incluye campana de flujo laminas, estufa con ambiente de CO_2 controlado, estanques para guardar líneas celulares y un microscopio invertido equipado con contraste de fase.

Finalmente, se debe destacar que la empresa dispone de un Vivero de Animales de Experimentación que dispone de las cepas de ratones de composición genética homogénea BALB/c, C3H/He y C57Bl/6.

1.2 Proyecto Tecnológico

A la fecha, en nuestro país los locos han sido mayoritariamente utilizados para consumo humano, hecho que ha limitado su empleo como fuente de un producto de alto valor agregado que se utiliza en el campo de la investigación biomédica y también por empresas de biotecnología, como es el caso de la **hemocianina** -proteína encargada del transporte de oxígeno, presente en la linfa de dichos moluscos- que se utiliza como proteína transportadora para producir anticuerpos en animales de experimentación, como inmunoestimulante en la terapia del cáncer y también, en la formulación de vacunas para humanos.

Nuestra empresa, en su afán de desarrollar productos de alto valor agregado, que den liderazgo a nuestro país en el campo de la Inmuno-Biotecnología en el cono Sur, propuso en este proyecto, producir industrialmente, hemocianina a partir del loco (*Concholepas concholepas)*, molusco prácticamente exclusivo de la costa chilena. Con este propósito, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estandarizar un procedimiento para obtener hemocianina de loco en cantidades y grado de pureza adecuadas.
2. Desarrollar las diferentes formulaciones del producto que pide el mercado (solución, liofilizado y precipitado en sulfato de amonio).
3. Establecer los protocolos básicos de control de calidad de los productos

Las hemocianinas son útiles para variadas aplicaciones en el campo de la inmunología y la biotecnología, debido a que son potentes inmunógenos, es decir, inducen la síntesis de gran cantidad de anticuerpos. Entre sus aplicaciones más clásicas, se cuentan la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales contra diferentes antígenos de interés en investigación y diagnóstico clínico. Más recientemente, la hemocianina está siendo evaluada por sus características de inmunoestimulante en el tratamiento de algunos tipos de cáncer a la vejiga en humanos, con excelentes resultados.

Tradicionalmente, para los propósitos anteriormente señalados, se ha utilizado hemocianina proveniente de una lapa que se encuentra en las costas del hemisferio norte, comunmente denominada como Keyhole Limpet (volcán de mar), correspondiente al molusco *Megathura crenulata,* cuya hemocianina se conoce como **KLH** por **K**eyhole **L**impet **H**aemocyanin.

La hemocianina de Keyhole Limpet -cuyo principal productor ha sido Pacific Bio-Marine Supplies de California USA- se ofrece en los catálogos de las principales empresas distribuidoras y productoras de reactivos para investigación Biomédica y Biotecnológica, a un precio que oscila en torno a los US$ 350 / gramo.

Sin embargo, la sobre-explotación del Keyhole Limpet ha provocado una escasez dramática de **KLH** en el mercado internacional y, cabe destacar que, la producción de anticuerpos tanto para investigación básica como aplicada así como para diagnóstico, dependen fuertemente de la disponibilidad de esta molécula a nivel mundial. Por otra parte, los alentadores resultados de la inmunoterapia de ciertos tipos de cáncer a

la vejiga en humanos, hacen suponer que la demanda de éste producto en el campo de la inmunofarmacología, presionará fuertemente al mercado para encontrar moléculas con similares propiedades.

Por lo tanto, encontrar alternativas adecuadas para reemplazar o complementar el uso de **KLH**, que ofrezcan ventajas comparativas tales como: abundancia del recurso, facilidad de obtención y purificación, además de cumplir con las características propicias en relación a la respuesta inmune, es una excelente oportunidad para dar valor agregado a una materia prima extraída de recursos marinos que son abundantes en nuestro país como son los locos y también las lapas, actualmente utilizados exclusivamente para uso comestibles humano.

Por las razones antes mencionadas, Biosonda S.A., fue contactada por empresas norteamericanas porque nuestra empresa desarrolló un producto denominado *Blue Carrier*, formulado en base a hemocianina de loco (*Concholepas concholepas*). Estas empresas requieren urgentemente una alternativa de **KLH** para continuar con sus proyectos y con la producción de insumos y anticuerpos para investigación.

La hemocianina producida por nuestra empresa, ha sido exitosamente utilizada en Chile por grupos de investigación de universidades y empresas de biotecnología, entre ellas Bios Chile I.G.S.A., e Inual Ltda., y también por nuestra propia empresa para el desarrollo de sus proyectos en el campo del inmunodiagnóstico de alimentos.

Sin embargo, el procedimiento desarrollado por nuestra empresa para producir ***Blue Carrier*** desde locos tenía un carácter muy artesanal (16 gramos por vez a partir de 100 locos) y, para poder acceder al mercado

internacional se requería de una producción a gran escala, de un producto estandarizado y de alta calidad, lo cual requería mejoras del proceso de extracción y purificación. También se requería desarrollar las diferentes formulaciones de hemocianina que se venden en el mercado (solución, liofilizado y precipitado en sulfato de amonio), así como también establecer los parámetros principales del control de calidad de los productos.

Nuestros cálculos indican que para satisfacer el 40% de la demanda de hemocianina del mercado internacional en un plazo de 5 años, bastaría con aproximadamente el 0,3 % de los locos que se extraen en forma autorizada anualmente en Chile (8.000.000 locos/año). Se debe destacar, que los locos se extraen bajo las normas establecidas por la Subsecretaría de Pesca para el recurso loco, el cual está sometido a un régimen bentónico de extracción y proceso -RES. N° 694 (1992), (D.O. 28/07/92) y D.S. N° 574 (1992), (D.O. 28/07/92)- y a vedas biológicas reproductoras (D.S. N° 268 (Ex) 1995; D.O. 29/12/95).

Es importante destacar que el desarrollo de este proyecto, ha abierto expectativas para buscar productos alternativos, con propiedades similares, en otras especies de moluscos existentes en el país, que no están sujetas a vedas ni restricciones de extracción, como es el caso de las lapas.

1.2.1. Innovación Tecnológica del proyecto y principales resultados

Entre los resultados más importantes que se lograron durante el desarrollo de este proyecto se puede mencionar:

1. Se estableció una red confiable de proveedores de locos con el Sindicato de pescadores Artesanales de Quintay (V Región).

2. Se estableció un protocolo de extracción de la hemolinfa con un alto grado de rendimiento y pureza, analizado mediante técnicas de microscopía electrónica y mediante técnicas fisico-químicas.

3. Se desarrollaron diferentes formulaciones del producto (solución estéril, solución no estéril con Glicerol, liofilizado y precipitado en sulfato de amonio y se iniciaron los estudios de estabilidad

4. Se estableció contacto con dos de las principales empresas norteamericanas distribuidoras de este tipo de producto (Pierce y Calbiochem) y también con una empresa de biotecnología que utiliza hemocianina en la producción de sus anticuerpos (Santa Cruz Biotechnology).

5. Se presentó una patente de invención sobre la obtención y uso de la hemocianina de loco como inmunoestimulante no específico en animales de experiemntación y con potencial uso en humanos.

1.3 Impacto Técnico-Económico del Proyecto

El desarrollo de este proyecto ha permitirdo elaborar en condiciones controladas y reproducibles, un producto de alto valor agregado, como es la hemocianina, a partir de un molusco chileno que hasta la fecha ha sido sobre-explotado para consumo humano.

Biosonda S.A., es el único productor y exportador de hemocianina de loco en el mercado nacional. La principal empresa internacional que produce este mismo insumo, pero a partir de otra especie de molusco como es *Megatrura crenulata* más conocido como Keyhole Limpet y su hemocianina como KLH, es Pacific Biomarine, de California, USA.

Actualmente, nuestro producto, recién está siendo introducido y tiene aproximadamente un 5% del mercado, con un posicionamiento creciente a nivel mundial, debido a que se trata de una hemocianina producida con un molusco que se encuentra solamente en las costas chilenas. Con el nombre de *Blue Carrier*, nuestro producto ya apareció en el catálogo de Pierce Chemical Comp, USA, (véase **Figura 9** de este documento) líder en la producción y comercialización de productos para investigación en el campo de la Inmunoquímica y, en Septiembre del presente año aparecerá en el catálogo de Calbiochem, USA, quien posee aproximadamente el 80% del mercado mundial de este tipo de productos (Fuente: Comunicación personal J. Snow, Vice Presidente Desarrollo de Productos, Calbiochem).

Para nuestra empresa, la exportación de hemocianina es decisiva en la consolidación de sus actividades biotecnológicas, porque permitirán el ingreso del capital necesario para ampliar las actividades de investigación relacionadas con el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos no sólo derivados de hemocianina.

2. EXPOSICION DEL PROBLEMA

El loco es un recurso marino chileno, extraordinariamente valioso desde el punto de vista económico, tanto para los pescadores artesanales como para la industria. Ha sido mermado de nuestras costas a causa de su sobre-explotación para consumo humano, hecho que ha limitado su utilización como fuente de un producto de alto valor agregado que se utiliza en el campo de la Investigación Biomédica básica y aplicada y también, en empresas de Biotecnología como es el caso de la **proteína hemocianina**, cuyas propiedades y usos potenciales se describen más adelante, partiendo con una pequeña descripción de la biología de este marisco único en el mundo.

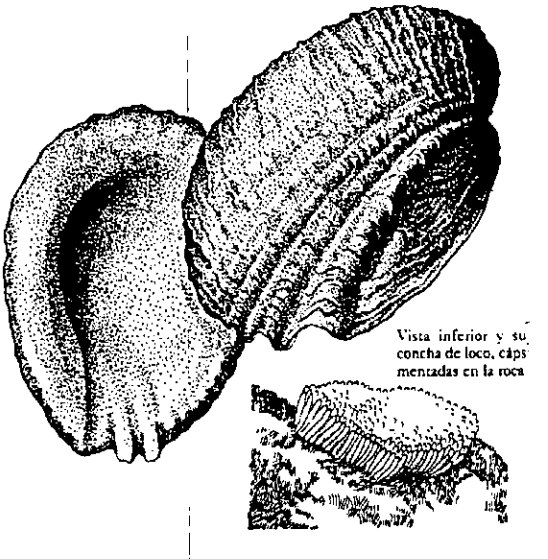
2.1 Algunos antecedentes de la Biología del loco.

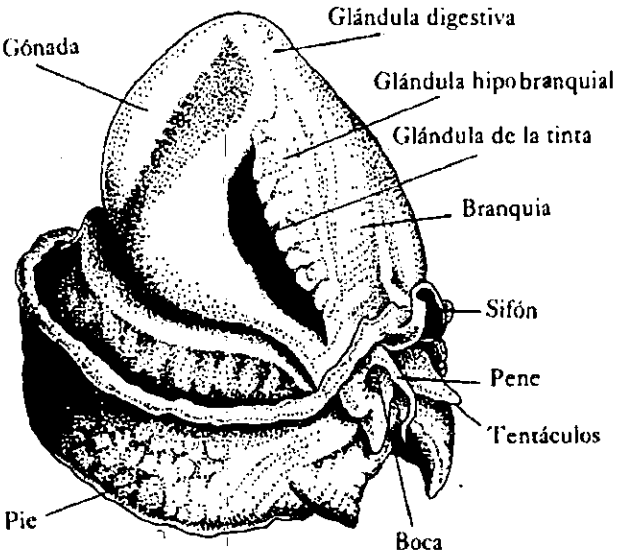
El loco, cuyo nombre científico es *Concholepas concholepas,* es un caracol marino que habita exclusivamente en las costas de Perú y Chile. Es un animal carnívoro de gran movilidad, que vive en ambientes rocosos y se alimenta en forma nocturna, principalmente de choritos, picorocos y piures. El loco es una especie con sexos separados, los cuales no se pueden distinguir externamente, pero realizando un análisis cuidadoso se puede distinguir el órgano copulador de los machos, en la región de la cabeza entre los tentáculos (Castilla, 1989), véase **Figura 1**.

Durante la época de reproducción, se produce apareamiento y las hembras luego de ser fecundadas depositan cápsulas de aproximadamente 2 cm de longitud que contienen alrededor de 10.000 huevos, que se localizan en las rocas. Estas agrupaciones de individuos, durante la época reproductiva se conocen con el nombre de "maicillos", véase **Figura 1**.

FIGURA 1

Morfología del molusco Loco (*Concholepas concholepas*)





Tomado de: Rema Nº 1. 1989. Pontificia Universidad Católica de Chile

Los huevos en el interior de las cápsulas originan pequeñas larvas (denominada *Pluteus*) que se dejan llevar por las corrientes marinas y después de 3 meses regresan a la costa donde sufren un proceso de metamorfosis y generan un loco, de unos pocos milímetros de longitud, que se fija en los roqueríos intermareales. Este loco pequeño recién asentado en la zona intermareal rocosa, se alimenta y crece y, si no es capturado, migra hacia la zona submareal, donde se encuentra la población adulta.

Aunque actualmente el loco está en plena explotación, está sujeto a un régimen bentónico de extracción y proceso, con las siguientes vedas: Litoral de la I a la VI Regiones entre el 01/01 y el 31/07 y entre el 01 y 31/12 de cada año; Litoral de la VII a la XII Regiones, entre el 01/01 y el 28/02 y entre 01/07 y el 31/12 de cada año (D.S. N° 268/95).

2.2 Estructura de la hemocianina

Las hemocianinas son glicoproteínas que se encuentran en la hemolinfa de numerosos moluscos y artropodos, cuya función es la respiración en virtud de su habilidad para unir varias moléculas de Oxígeno en un sitio activo peculiar, que contiene átomos de Cobre (Van Holde y Miller, 1995).

Una de las características más notables de las hemocianinas es su gran tamaño, de hecho, es la proteína de mayor masa relativa conocida a la fecha (en torno a $4{,}5 \times 10^6 - 4 \times 10^7$ KD), razón por la cual ha sido modelo de estudio para conocer el ensamble y organización de macromoléculas en el campo de la fisico-química de proteínas (Harris, *et al.*, 1993; Van Holde y Miller, 1995; Orlova, *et al.*, 1997).

Los estudios de la estructura de la hemocianina mediante microscopía electrónica utilizando tinción negativa, han demostrado que en el caso de los Artropodos, las hemocianinas están formadas por ensambles constituidos por bloques que contienen entre 1 y 8 hexámeros. En cambio, las hemocianinas de moluscos están organizadas como oligomeros con una estructura cuaternaria de cilindros-huecos que tienen un diámetro externo de aproximadamente 370 A°. Cada cilindro constituye un decamero que está compuesto de 10 subunidades de aproximadamente 400-KD. En gastropodos, los decameros generalmente se encuentra ensamblados de a dos, cara a cara, constituyendo una estructura característica denominada di-decamero.

Recientemente, Söhngen, *et al.*, (1997) utilizando microscopía electrónica de transmisión analítica para estudiar la estructura de KLH, han descrito dos formas moleculares distintas, independientes estructuralmente, denominadas KLH1 y KLH2, cuyas subunidades difieren en tamaño, en la forma de agregación preferente y en la respuesta inmune que provocan *in vivo* en animales de experimentación (Swerdlow, *et al.*, 1994, 1996).

La estructura de la hemocianina del loco chileno era prácticamente desconocida, salvo los estudios preliminares realizados por el Dapartamento de Investigación de Biosonda S.A.. Estos antecedentes muestran que la hemocianina del loco chileno tiene una composición de aminoácidos similar a otras hemocianinas (véase **Tabla 1**), con un alto contenido de residuos-epsilón-lisina, de gran utilidad cuando se requiere acoplar péptidos y haptenos mediante glutaraldehído o carbodiimida.

Estudios mediante microscopía de transmisión, utilizando tinción negativa, muestran que la hemocianina del loco tiene la estructura de un cilindro hueco, con una forma de agregación preferente de dos decámeros, como se

presenta en la **Figura 2**, al igual que las otras hemocianinas de moluscos pero, es de menor tamaño, como lo demuestran estudios realizados por nuestra empresa mediante columnas de filtración en gel de Sepharose 4B (véase **Figura 3**).

Finalmente, es interesante destacar que la hemocianina de loco presenta una escasa reacción cruzada con KLH, cuando se analiza mediante un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) e inmunodifusión, el suero de ratones Balb/c inmunizados con cantidades similares de cada tipo de hemocianina en presencia de Coadyuvante de Freund's Completo. La escasa reacción cruzada entre ambos tipos de hemocianina sugiere diferencias estructurales y probablemente en su contenido y tipo de carbohidratos que deben ser determinadas.

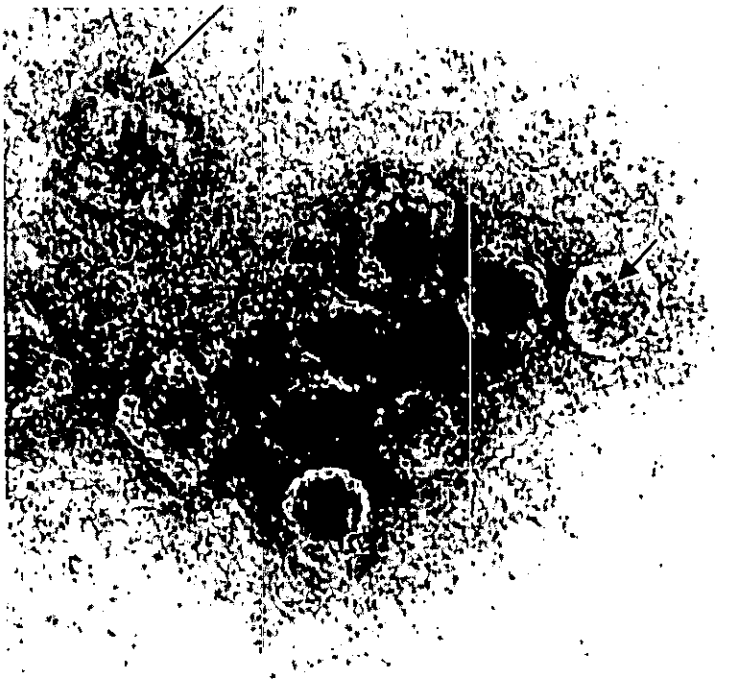
TABLA 1

Composicion de amino acidos de hemocianina de *Concholepas concholepas*

Amino acido	% Molar
ASP	11.7
GLU	11.7
SER	5.4
GLY	6.7
HIS	5.9
ARG	4.7
THR	3.9
ALA	7.7
PRO	5.8
TYR	3.2
VAL	5.4
MET	1.5
$(CYS)^2$	0.2
ILE	3.1
LEU	7.5
PHE	5.5
LYS	10.3

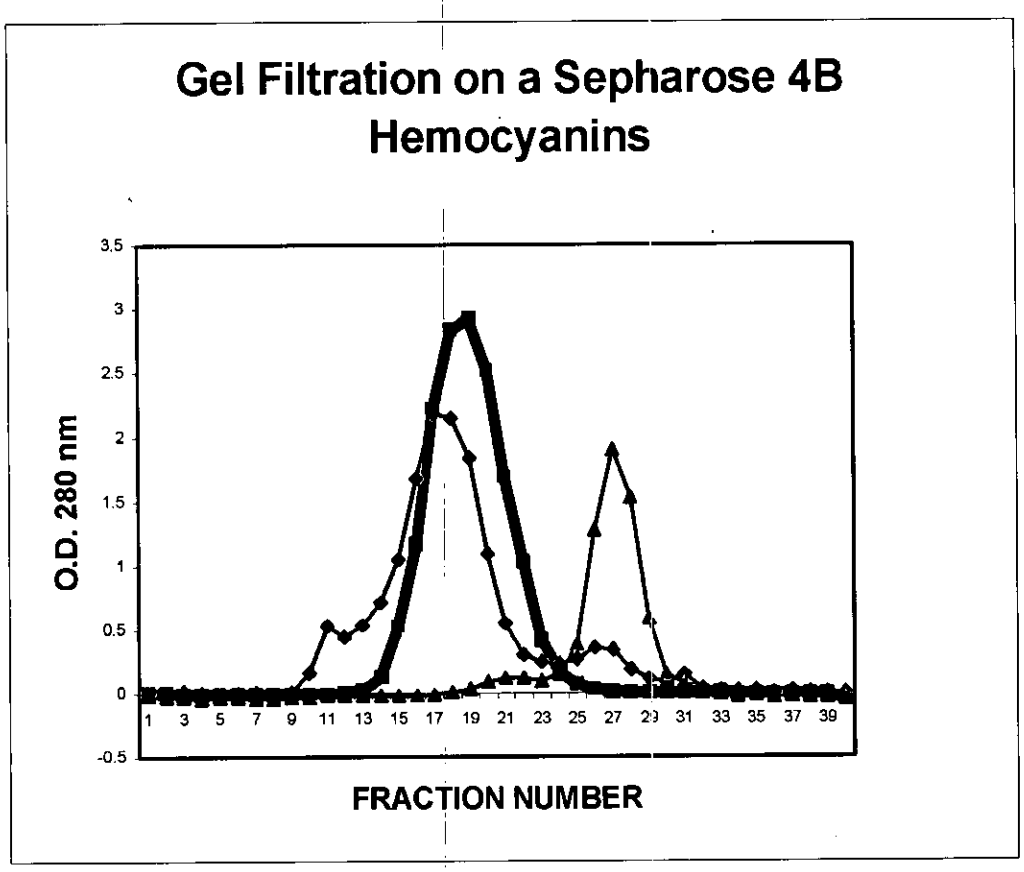
FIGURA 2

Estructura de la hemocianina de *Concholepas concholepas*



Microscopia Electrónica de hemocianina purificada desde la linfa de loco *(Concholepas concholepas)* observada mediante tinción negativa. **Nótese la estructura de cilindro hueco de la proteína vista desde arriba (flecha corta) o de lado, en donde además se observan las subunidades (flecha larga).**

FIGURA 3



– *Hemocianina de Concholepas concholepas*
– Hemocianina de Keyhole Limpet
– Inmunoglobulina G monoclonal de ratón

2.3 Uso de las hemocianinas en el campo de la Inmunología

i) Como proteína transportadora

La hemocianina más utilizada en Inmunobiología se extrae de un molusco del hemisferio norte, de nombre científico *Megathura crenulata*, que corresponde a una lapa conocida como "**K**eyhole Limpet **H**emocyanin o **KLH**" (Hemocianina de Volcán de Mar). Esta proteína presenta una alta capacidad inmunogénica (inductora de la producción de anticuerpos en vertebrados) a causa de su alto peso molecular (en torno a $4{,}5 \times 10^6 - 4 \times 10^7$ KDa) y también por su origen filogenético, muy distante de los vertebrados. Una simple inyección intracutánea de KLH induce una alta tasa de producción de anticuerpos específicos contra ella, en prácticamente todos los invertebrados, incluyendo los humanos (Hercowitz, *et al.*, 1972; Harris, *et al.*, 1993; Swerdlow, *et al.*, 1996; Orlova, *et al.*, 1997).

Clásicamente, la hemocianina se ha utilizado como proteína transportadora para producir anticuerpos en animales de experimentación, debido a que no todas las moléculas son inmunogénicas (generadoras de anticuerpos). Por ejemplo, numerosas substancias pequeñas de masa molecular inferior a 5 KDa (alergenos, drogas, mono u oligosacáridos y oligopéptidos) sólo pueden actuar como inmunógenos al ser acopladas químicamente a macromoléculas de inmunogenicidad probada y entre ellas, una de las más utilizadas como transportador es la hemocianina de moluscos. La hemocianina contiene un porcentaje importante de lisinas cuyos residuos e-amino pueden ser

sustituidos mediante conjugación con péptidos y moléculas pequeñas haciendo posible la producción de anticuerpos.

Los **anticuerpos** son proteínas producidas por los vertebrados en respuesta específica contra un **antígeno** y, por esta propiedad, durante años han sido utilizados como sondas de diagnóstico en el campo de la biomedicina y en el campo industrial, como herramienta para purificar numerosas sustancias de interés terapéutico humano y animal. Por lo tanto, la producción de anticuerpos contra antígenos de interés es un gran negocio y por lo tanto, todos aquellos insumos que permitan su desarrollo y producción tienen relevancia.

ii) Como inmunoestimulante no específico

Es un hecho conocido que los inmunoestimulantes no específicos son capaces de modular la respuesta inmune, al punto de actuar como efectivos agentes anti-tumorales. Al respecto, uno de los modelos más ampliamente documentado y clínicamente establecido, es la terapia de ciertos tumores recurrentes que afectan la mucosa de la vejiga en humanos, que son tratados localmente mediante instilación con vacuna de la BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) (Olsson, *et al*, 1974; Morales, *et al.*, 1976; Lamm, *et al.*, 1981; 1982; Morales, *et al.*, 1981, Brosman, 1982; Pang y Morales, 1982; Shapiro, *et al.*, 1983; .Brosman, 1985; Böhle, *et al.*, 1990

Sin embargo, a pesar del éxito de la inmunoterapia con BCG frente a la quimioterapia, los efectos secundarios como cistitis

severa en casi el 90 % de los pacientes (Flamm, *et al.*, 1990) y los peligros potenciales de infección y toxicidad sistémicas por tratarse de una vacuna viva (Lamm, *et al.*, 1986), llevaron a evaluar otras sustancias inmunoestimulantes, con menos efectos laterales y mayor estabilidad. Es así como se consideró el uso de las hemocianinas, cuyas propiedades como antígeno experimental e inmunoestimulante en animales de experimentación, eran ampliamente conocidas (revisión en Van Holde y Miller, 1995).

Los trabajos pioneros de Olsson, *et al.*, (1974) demostraron una disminución en la frecuencia de tumores vesicales recurrentes en pacientes diagnosticados con cáncer a la vejiga, mediante un tratamiento con 5 mg de hemocianina de Keyhole Limpet (KLH) inyectada subcutáneamente. Trabajos posteriores de varios investigadores, llevaron a que hoy día, se dispone de una preparación de KLH con grado-clínico, denominada "KLH-ImmuneActivator®; KLH-IA", producida por Organon Teknica/BRI, Rockville, Maryland, USA; que ha demostrado tener una potente actividad anti-tumoral, comparable a la de la BCG (Swerdlow, *et al.*, 1994, 1996).

Finalmente, se debe destacar que los alentadores resultados de las investigaciones biomédicas en terapias contra el cáncer y el SIDA, donde las propiedades inmunoestimulantes de KLH la han convertido en una opción plausible para el desarrollo de un tratamiento para estas patologías (Flamm, *et al.*, 1990; Nailor, et al., 1991; Swerdlow, *et al.*, 1994; Helling, *et al.*, 1994; Yacyshyn, *et al., 1995*) hacen suponer que la demanda de KLH en el campo de

la inmunofarmacología presionará fuertemente la búsqueda de moléculas con similares propiedades.

Por otra parte, se ha demostrado que KLH posee residuos oligosacáridos del tipo glicano que también están presentes en *Schistosoma mansoni*, aumentando las aplicaciones potenciales de KLH en el diagnóstico y terapia de la schistosomiasis (Grzych, *et al.*, 1987).

Por las razones anteriormente señaladas, encontrar substancias alternativas para complementar el uso de KLH, que ofrezcan ventajas comparativas tales como: abundancia del recurso, facilidad de obtención y purificación además de cumplir con las características adecuadas con respecto a la respuesta inmune, puede considerarse de gran relevancia.

Pensamos que la hemocianina del loco, molusco abundante y prácticamente exclusivo de las costas chilenas, podría responder a estas expectativas, como de hecho lo demuestran los alentadores resultados de su uso como proteína transportadora en la producción de anticuerpos monoclonales contra Gizerosina, amina biogénica presente en harina de pescado que corresponde a un hapteno y para la cual hoy día nuestra empresa dispone de anticuerpos específicos (véase Becker, *et al.*, 1988).

Finalmente, a modo de resumen, en este proyecto se planteó en primer lugar, desarrollar una metodología a gran escala para obtener hemocianina a partir de loco (*Concholepas concholepas*) con un alto grado de pureza y estabilidad, que pueda ser utilizado en forma

confiable internacionalmente. En segundo lugar, se planteó desarrollar las diferentes formulaciones del producto que se comercializan internacionalmente y, en tercer lugar, se planteó establecer los protocolos de control de calidad de los productos vía el conocimiento de algunos parámetros fisico-químicos básicos, que permitan asegurar su pureza y homogeneidad.

3. OBJETIVOS TECNICOS

El objetivo general de este proyecto fue desarrollar una metodología semi-industrial, para obtener hemocianina a partir de loco (*Concholepas concholepas*) con un alto grado de pureza y estabilidad, para preparar las diferentes formulaciones del producto que se comercializan internacionalmente, estas corresponden a hemocianina en solución salina, hemocianina liofilizada y hemocianina precipitada en sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$.

Los objetivos específicos desarrollados propuestos para alcanzar las metas del proyecto han sido:

3.1 Establecer una red confiable y eficiente de proveedores de locos.

3.2 Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción de hemocianina

3.3 Establecimiento de parámetros para estandarizar la purificación de hemocianina.

3.4 Desarrollo de las tres formulaciones principales de hemocianina.

3.5 Estudios de estabilidad de la materia prima y de los productos terminados.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción del crudo de linfa conteniendo hemocianina

4.1.1 Extracción de los locos desde Quintay (V Región)

Los locos fueron sacados individualmente por pescadores artesanales, aproximadamente 250 por día, con las características de tamaño impuestas por la Sub-Secretaría de Pesca. Para mantenerlos vivos, el día de su captura se mantuvieron momentáneamente aposados en los roquerías de la playa, esperando su transporte a Santiago.

4.1.2 Transporte de locos a Santiago

Los locos fueron depositados en bandejas de plástico previamente desinfectadas y acondicionadas con agua de mar y fueron transportados rápidamente a Santiago, al Laboratorio de Inmunología de Biosonda S.A., en la cabina de carga de una camioneta Citroen C15.

4.1.3 Extracción del crudo de linfa conteniendo hemocianina

Los locos vivos fueron procesados de inmediato, la mayor parte de ellos recibió punción en él pié e inmediatamente se colocaran sobre bandejas de plástico previamente acondicionadas, para recibir la hemolinfa.

También se evaluó el procedimiento de punción cardiaca.

La hemolinfa se colectó cuidadosamente, se centrifugó y se filtró para clarificar.

Para determinar la presencia de posibles contaminantes en el crudo, se tomaron muestras periódicamente, las cuales fueron analizadas mediante inspección ocular en un microscopio de contraste de fase.

4.1.4 Determinación de algunos parámetros para estandarizar las características de la materia prima

Se determinaron los siguientes parámetros para caracterizar la materia prima: pH, espectro de absorción UV-visible y concentración de proteínas.

4.2 Purificación de hemocianina

4.2.1 Fraccionamiento de la hemolinfa mediante precipitación con Sulfato de Amonio

Se determinó el porcentaje de sulfato de amonio que permite precipitar mayoritariamente hemocianina.

Para determinar la calidad del producto obtenido y la presencia de contaminantes se realizó una determinación de proteínas en el sobrenadante mediante el método de Bradford comercializado por Pierce Chemical (USA).

La precipitación se llevó a cabo en condiciones controladas, en una vitrina refrigerada a 4°C.

4.2.2 Diálisis para eliminar el Sulfato de Amonio

Se estandarizaron los parámetros de diálisis a 4°C, específicamente tamaño de la bolsa, cantidad de hemocianina, volumen por cada cambio y número de cambios /cantidad de muestra. El control de la presencia de Sulfato de Amonio se realizó mediante un reactivo específico, que produce un precipitado blanco en presencia de este compuesto.

Para determinar el grado de pureza del producto obtenido, se realizó una cromatografía en una columna de Sepharose-S200.

4.2.3 Concentración mediante centrifugación

La concentración del material dializado, se realizó mediante centrifugación en condiciones controladas de velocidad y temperatura en una centrifuga Sorval.

4.3. Desarrollo de formulaciones principales de hemocianina

Se desarrollaron cuatro formulaciones a partir de la hemolinfa purificada: solución estéril, solución no estéril con glicerol, liofilizado y precipitado en sulfato de amonio. Para cada formulación se estableció la concentración óptima de proteínas, espectro de absorción UV-visible y contenido de LPS.

4.4 Estudios de estabilidad

Se desarrollaron estudios de estabilidad a temperatura ambiente y a 4°C.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Establecimiento de una red confiable y eficiente de proveedores de locos.

Al iniciar este proyecto, para tener información confiable sobre la situación general de recurso loco en nuestro país, se realizó una reunión en Valparaíso, en la Subsecretaría de Pesca con el Sr. Darío Rivas, encargado nacional de este molusco, quién además nos dió información sobre las personas que podríamos contactar para establecer una red eficiente de proveedores, que estuviera trabajando estrictamente bajo las normas emanadas de esta Subsecretaría, para preservar este recurso.

Para desarrollar el proyecto, se estableció un acuerdo para proveernos de locos con el Sindicato de Pescadores Artesanales de Quintay, presidido en ese momento por Don René Barrios y asesorado por el Tecnólogo en Recursos Marinos Don Rolando Aranguez Esta agrupación nos proveyó de todos los locos utilizados en el transcurso del proyecto.

Al inicio del proyecto, se contempló una primera producción con 3.000 unidades, sin embargo, por razones de fuerza mayor en conocimiento de FONTEC, esta primera producción se realizó sólo con 1.000 unidades de características óptimas en cuanto a tamaño y peso del molusco (véase **Figura 4**).

Posteriormente, para extraer las 2.000 piezas restantes, se solicitó a la Sub-Secretaría de Pesca la autorización de un Proyecto de Pesca de Investigación, el que fue aprobado en Mayo del presente año. Los locos fueron extraídos en las mismas condiciones, cantidades y tiempos realizados anteriormente.

En resumen, para llevar adelante el procedimiento de extracción y para determinar la reproducibilidad del procedimiento, cada vez se trabajó con el volumen de crudo aportado 1.000 locos, que es 10 veces más cantidad de locos que en el procedimiento inicial desarrollado por nuestra empresa. Además, este volumen de crudo es, momentáneamente, el más cómodo para trabajar, debido a que una de las etapas claves del proceso, que corresponde a la concentración de la linfa mediante centrifugación, no se realiza en la empresa porque el equipo no está disponible en Biosonda, siendo solicitado a laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. Universidad Católica.

5.2 Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción de la hemocianina

Se determinó las condiciones de transporte óptimo de los locos a Santiago para que se mantengan vivos. Los moluscos después de la extracción deben mantener esta condición para asegurar la óptima calidad del crudo de linfa.

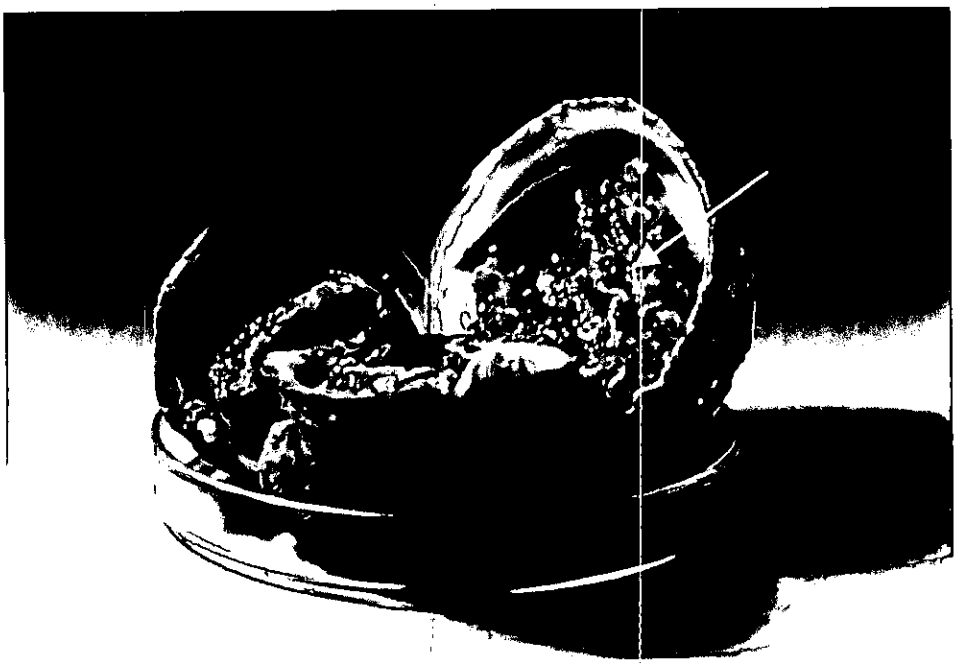
El procedimiento de obtención de la hemolinfa mediante punción en el pié (**Figura 4**) resultó más eficiente que la punción cardiaca. Sin embargo, no descartamos la aplicación de este segundo procedimiento en el futuro, sobretodo si se considera que los locos podrían utilizarce más de una vez

y que en estas condiciones, la hemocianina se podría obtener libre de contaminación por microorganismos.

Se logró un procedimiento rápido, confiable y reproducible que permite manipular 250 locos por día y además permite obtener un crudo de linfa de intenso color azul, como se muestra en la **Figura 5**, el cual confirma la excelencia de la materia prima obtenida, pues indica que la hemocianina mantiene unidos los átomos de oxígeno.

FIGURA 4

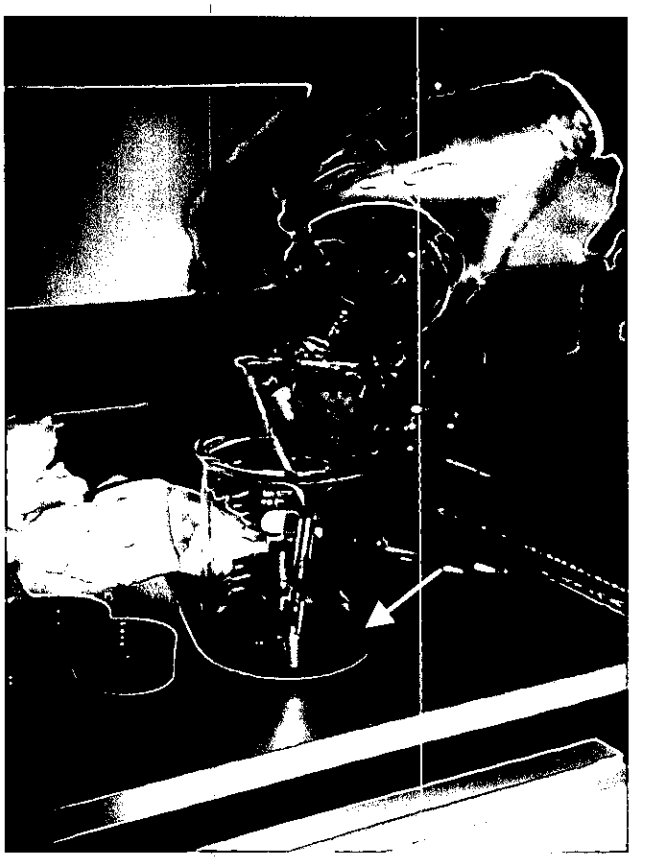
Locos utilizados en la preparación de un crudo de hemolinfa



La flecha señala la región del pie del molusco.

FIGURA 5

Aspecto de un crudo de hemolinfa



La flecha señala el intenso color azul de la linfa fresca, conteniendo hemocianina

5.3 Establecimiento de parámetros para estandarizar la purificación de la hemocianina.

La cantidad de hemocianina obtenida se determinó midiendo proteínas en cada una de las etapas del procedimiento. Para determinar la concentración de Sulfato de amonio más adecuada para precipitar la proteína, se realizaron precipitaciones entre un 20 y un 50%.

La calidad de la materia prima obtenida luego de precipitar el crudo con $(NH_4)_2SO_4$, dializar y concentrar mediante centrifugación, se determinó mediante un espectro de absorción a diferentes longitudes de onda (**Figura 6**) y mediante una columna de filtración de Sepaharose-4B-200, cuyos resultados se presentan en la **Figura 7**. A 280 nm se observa un sólo pico simétrico, confirmando la pureza del producto obtenido. Se debe destacar la alta reproducibilidad de este procedimiento, el cual ha pasado a ser uno de los principales controles de calidad de la pureza e integridad del producto.

También, para determinar la pureza de la preparación se realizaron evaluaciones utilizando el procedimiento de tinción negativa y posterior observación mediante microscopía de transmisión, obteniéndose resultados altamente satisfactorios en cuanto a la homogeneidad del producto.

Finalmente, para determinar el grado de contaminación de las preparaciones con microorganismos, se realizaron determinaciones de Lipopolisacárido (LPS) con el método Gel-clot de Ensayo del Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL), utilizado mundialmente para estos propósitos en vacunas e inyectables para humanos, encontrándose un

bajo contenido de LPS, lo que indica que el procedimiento de preparación de la hemocianina está bajo control y que adecuando mejor nuestras instalaciones -proyecto que está en evaluación- no será difícil obtener un producto que en el futuro pueda ser utilizado en humanos.

5.4 Desarrollo de formulaciones de la hemocianina

Se logró desarrollar las siguientes preparaciones en base a la hemocianina purificada:

- Solución estéril: Se logró una formulación de alta pureza que contiene 200 mg/ml en tampón fosfato salino (PBS) más 0,15 M NaCl. Esta preparación se presenta en frascos de vidrio transparentes de alta calidad que contienen 0,5 ml del producto. Los frascos se tapan con una tapa de goma de buena calidad y posteriormente, se sellan con un aro metálico.

- Solución no estéril: Se logró una formulación que contiene 150 mg/ml en tampón fosfato salino (PBS), 0,15 M NaCl y debido a que debe ser mantenida a -20ºC para evitar su contaminación con microorganismos, contiene un 50% de Glicerol. Esta preparación se presenta en frascos de vidrio transparentes ó ámbar de alta calidad, que contienen aproximadamente 10 ml del producto. Los frascos se tapan con una tapa de goma de buena calidad y posteriormente, se sellan con un aro metálico. Véase **Figura 8**.

- Precipitado en Sulfato de Amonio: Se logró una preparación de alta concentración, la cual debe ser manipulada en condiciones especiales debido a su consistencia espesa.

- Liofilizado: Aunque se logró una preparación de alta concentración, creemos que está formulación debe ser mejorada porque al solubilizar nuevamente la proteína con agua bidestilada, se presentan problemas de solubilidad, los cuales aunque en principio no debieran afectar la inmunogenicidad del la proteína, sí afectan la sustitución de la misma cuando se trabaja con haptenos y péptidos pequeños.

5.5 Estudios de estabilidad.

Actualmente se desarrollan estudios de estabilidad de cada una de las formulaciones tanto a temperatura ambiente como a 4°C, siendo destacable la alta estabilidad que presenta la hemocianina en ambas condiciones. Preparaciones realizadas en un período previo a iniciar este proyecto, que ya tienen dos años de antigüedad, mantienen intactas sus propiedades cuando se mantienen a 4°C.

5.6 Primeras exportaciones de hemocianina de loco bajo el nombre comercial de *Blue Carrier*.

En enero del presente año, se realizó la primera exportación de 100 g de *Blue Carrier*, en la forma de 50 frascos conteniendo de 2 g de hemocianina de loco no estéril en glicerol, a la firma norteamericana Santa Cruz Biotechnology, quienes la utilizan para producir anticuerpos policlonales y monoclonales contra péptidos de interés en investigación y diagnóstico clínico. Se debe destacar, que ahora en Agosto, nuevamente esta firma repitió su pedido, lo que nos indica que el producto fabricado por nuestra empresa cumplió satisfactoriamente las expectativas de esta empresa.

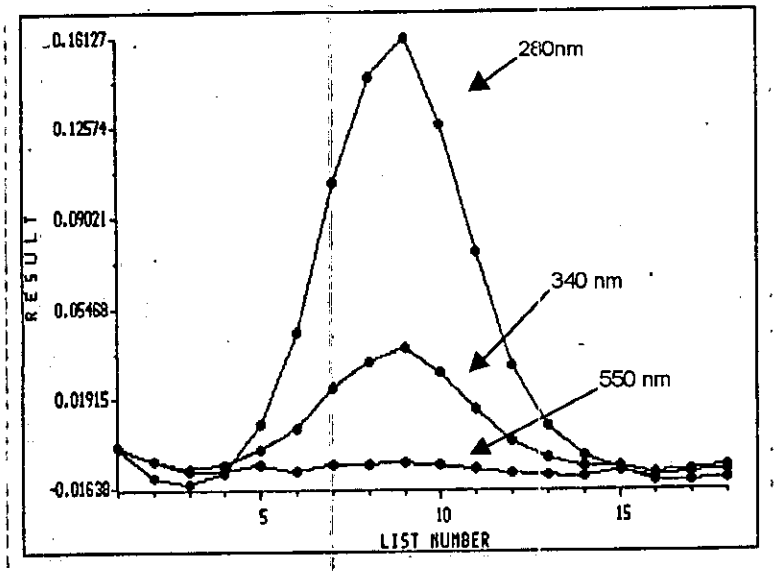
En febrero del presente año, se realizó la segunda exportación de 120 g del producto, en la forma de 100 frascos conteniendo 0,5 ml de hemocianina estéril, a la firma Pierce Chemical Company de norteamérica. Esta empresa, líder en el desarrollo, producción y comercialización de productos para investigación en el campo de la inmunoquímica, incorporó nuestro producto en su catálogo, el cual es distribuido a todos los laboratorios de investigación y empresas de biotecnología del mundo (Véase copia en **Figura 9**).

De manera similar a la anterior, también se realizó otra exportación de 150 g de hemocianina en Mayo del presente año, a la empresa norteamericana Calbiochem. Se enviaron dos de las formulaciones desarrolladas con el preente proyecto: hemocianina en solución estéril y hemocianina no estéril con Glicerol

Las exportaciones antes señaladas representan un gran logro del presente proyecto como se refleja en numerosas publicaciones aparecidas en la prensa local (Véase **Anexo 1**) y abren auspiciosas expectativas para un producto nacional de óptimas características, cuyas potencialidades para ser utilizado en humanos actualmente están siendo investigadas por nuestra empresa, con el apoyo de un proyecto FONDECYT.

Figura 7

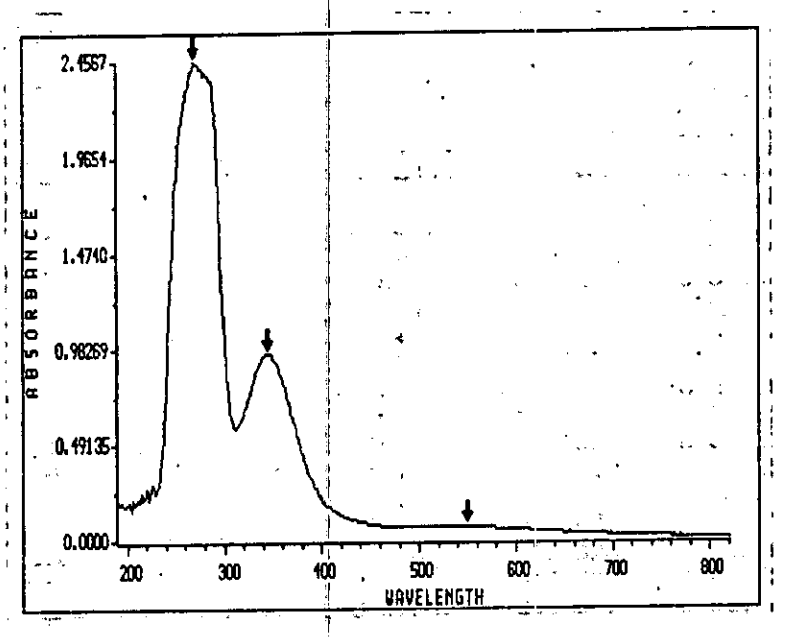
Perfil de filtración en gel en una columna de Sepharose 4B-200 de hemocianina purificada



En la figura, la ordenada representa la densidad óptica a cada una de las longitudes de ondas señaladas en nm y la absisa, representa cada fracción colectada desde la columna de filtración.

Figura 6

Espectro de absorción de hemocianina de purificada desde la linfa del molusco *Concholepas concholepas*



Las flechas indican los máximos de absorción de la hemocianina, en las longitudes de onda 268 nm, 344 nm y 550 nm.

FIGURA 8

Presentación del producto *Blue Carrier*
(Hemocianina de Loco)

FIGURA 9

Presentación de *Blue Carrier* en el catálogo de Pierce Chemical Co, USA

New ... New T...

Pierce products appearing in Chapter 1-2 were introduced since the last Pierce Catalog was published. For more information on these products, please log onto the Pierce web site at http://www.piercenet.com or contact our Technical Assistance Team at 815-968-0747 (U.S. toll-free: 800-874-3723). Outside the U.S., contact your local distributor. Many of these products have been featured in technical articles that appeared in our quarterly journal *Previews*. Many *Previews* articles, some of which are available via our web site, describe new and unique applications for Pierce products, some of which could benefit your own research.

PIERCE

Antibody Production and Purification

Keyhole Limpet Hemocyanin Subunits

A new GMP version for research applications.

New GMP-Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) Subunits consist of two immunoactive subunits that have molecular weights of 350 kD and 390 kD. Pierce supplies these subunits as a sterile, pyrogen-free powder. The subunits have been lyophilized from a glycine buffer and are more than 99% pure. GMP-KLH comes with 10 ml of sterile water for injection. Under sterile conditions, researchers simply remove the solvent with a syringe and inject it into the vial containing the GMP-KLH Subunits. The GMP-KLH Subunits are now rehydrated and ready for antigen conjugation.

Features/Benefits:
- One-step hydration
- Supplied sterile and pyrogen-free
- Stable subunit size

Ordering Information

Product #	Description	Pkg. Size	U.S. Price
77609ZZ	**GMP-KLH Subunits**	Kit	$225
	Includes: Lyophilized KLH	1 x 10 mg	
	Sterile Solvent	1 x 10 ml	

For information on other Pierce Carrier Protein Systems, see Section 2-1, page 2.

Blue Carrier® Immunogenic Protein

A solubilized, inexpensive alternative to KLH.

Blue Carrier® Immunogenic Protein is a Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)-like hemocyanin,[1] purified from the mollusk *Concholepas concholepas*. Mollusk hemocyanin, in general, is highly immunogenic due to its large size and distance from mammals along the phylogenetic tree. Blue Carrier® Protein has been shown to be immunogenic[2] and is supplied already solubilized in a sterile, ready-to-conjugate PBS solution.

Features/Benefits:
- Less expensive than KLH
- Pre-solubilized at 200 mg/ml in 0.5 ml of PBS buffer
- Provided sterile

References
1. Herscowitz, H.B., Harell, W.W. and Skalsky, A.B. (1972) Immunochemical properties of a purified keyhole limpet hemocyanin. *Immunol.* 22, 51-61.
2. Becker, M.I., et al. (1996) Development of monoclonal antibodies to gizzerosine, a toxic component present in fish meal. *Hybridoma* (in press).

Ordering Information

Product #	Description	Pkg. Size	U.S. Price
77130ZZ	**Blue Carrier® Immunogenic Protein**	100 mg	$100

New Products

6. CONCLUSIONES

1. Se estableció una red confiable de proveedores de locos con el Sindicato de Pescadores Artesanales de Quintay, en la V Región.

2. Se estableció un procedimiento rápido y confiable de producción de un crudo de hemolinfa a partir de 1.000 locos. El procedimiento completo se reprodujo 2 veces más, con 1.000 locos cada vez, demostrándose la reproducibilidad general del procedimiento.

3. Se estableció un procedimiento rápido, reproducible y confiable para obtener hemocinina de óptima calidad en cuanto a concentración, pureza y contenido de LPS.

4. Se lograron diferentes formulaciones del producto: precipitado en sulfato de amonio, solución estéril de 200 mg/ml y solución no estéril de 150 mg/ml en Glicerol. Parte de estas dos últimas formulaciones han sido adquiridas por las empresas Pierce Chemical (USA) y Santa Cruz Biotechnology (USA), distribuidor y usuario terminal, respectivamente, de acuerdo a los términos presentados en el estudio de mercado del proyecto.

5. Se presentó una patente de invención sobre la obtención y uso de la hemocianina de loco como inmunoestimulante no específico en animales de experiemntación y con potencial uso en humanos.

7. IMPLEMENTACION DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

Dado el éxito del proyecto, por cuanto se logró desarrollar al menos dos formulaciones que ya se encuentran en los catálogos de dos prestigiadas firmas internacionales, que se dedican a la distribución de reactivos para Investigación Básica y Aplicada, se espera continuar con la promoción ya realizada por la empresa, la cual ha consistido en:

- Entrega de muestras a los potenciales clientes
- Visitas del Gerente de la empresa a las firmas interesadas de la costa Oeste de Estados Unidos.
- Alianza estratégica con la Fundación Comunidad Económica Europea-Chile, para la búsqueda de mercados europeos.
- Compra de Página Web (http/www.cepri.cl/biosonda)
- Contactos telefónicos-Fax y E-mail entre potenciales clientes y Biosonda S.A.
- Compra de publicidad en revista Nature, publicación periódica Inglesa dedicada a la difusión de los trabajos científicos de punta, más relevantes en investigación científica básica (Véase **Figura 10**).
- Publicación de trabajos científicos elaborados por el staff científico de la empresa, en medios nacionales e internacionales.
- Presentación en Congresos Científicos nacionales e internacionales de las propiedades estructurales y de aplicación de la proteína.

Para la materialización del plan, se realizarán las mismas actividades anteriores potenciándose la visita a las empresas interesadas y, se incentivará la traída de compradores extranjeros. A través de contactos directos y de la utilización de la red comercial de Pro-Chile y de otros entes ligados al tema.

8. BIBLIOGRAFIA GENERAL DEL PROYECTO

Becker M. I., Aguayo J., Jamett A., Juica F., Yudelevich A., De Ioannes A. E..(1996). An alternative ELISA for T4 determination based on idiotype-anti-idiotype interaction and method for anti-idiotype monoclonal selection by latex agglutination. J. Immunol. Methods 192: 73 –85.

Becker M. I., Carrasco I., Beltrán C., Torres M., Jaureguiberry B., De Ioannes A. E. (1997). Development of monoclonal antibodies to Gizzerosine, a toxic component present in fish meal. Aceptado en Hybridoma.

Böhle A., Nowc C.H., Ulmer A.J., Musehold J., Gerdes J., Hofstetter A.G., Flad H.D. (1990). Elevations of cytokines interleukin -1, interleukin-2 and Tumor necrosis factor in the urine of patients after intravesical bacillus Calmette-Guerin immunotgerapy. J. Urology 144: 59 - 64.

Bonafe C.F., Araujo J:R:V., Silva J.L. (1994). Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. Biochemistry 33: 2651 - 2660.

Bowen Yacyshyn M.B., Poppema S., Berg A., MacLean G., Reddish M.A., Meikle A., Longenecker B.M. (1995). $CD69^+$ and $HLA\text{-}DR^+$ activation antigens on peripheral blood lymphocyte populations in metastatic breast and ovarian cancer patients: correlations with survical following active specific immunotherapy. Int. J. Cancer 61: 470 - 474.

Brosman S.A. (1982). The use of bacillus *Calmette-Guérin* in the therapy of bladder carcinoma in situ. J. Urol. 134: 220.

Brosman S. A. (1985). The use of bacillus Calmette-Guérin in the therapy of bladder carcinoma in situ. J. Urol. 134: 220.

Flamm J., Bucher A., Höltl W., Albrecht W. (1990). Recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: Adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy. A prospective ramdomized trial. J. Urology 144: 260 - 263.

Garrido J., De Ioannes A. E. (1981). Electron Microscopy of natural IgM-like Hemoaglutinin of the ratfish *C. callorynchus*. Dev. Comp. Immunol. 5: 691 – 696.

Green A.A., Borella L. (1971). In vitro response of human leukocytes to associated and dissociated hemocyanin. J. Immunol. 107: 293 - 297.

Grzych J:M:, Dissous C., Capron M., Torres S., Lambert P.H., Capron A. (1987). Schistosoma mansoni shares a protective carbohydrate epitope with Keyhole Limpet Hemocyanin. J. Exp. Med. 165: 865 - 878.

Harlow E., Lane D. (1988). Antibodies. A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

Harris J.B., Gebauer W., Markl J. (1993). Immunoelectron microscopy of hemocyanin from Keyhole Limpet (Megathura crenulata): a parallel subunit model. J. Structural Biol. 11: 96 - 104.

Helling F., Shang A., Calves M., Zhang S., Ren S., Yu R., Oettgen H., Livingston P. (1994). G_{D3} vaccines for melanoma: superior immunogenicity of Keyhole Limpet Hemocyanin conjugate vaccines. Cancer Res. 54: 197 - 203.

Herkowitz H. B., Harold W.W., Stavisky A.B. (1972). Immunochemical and immunogenetic properties of a purified keyhole limpet haemocyanin. Immnology 22: 51

Jurincic C.D., EngelmanU., Gash J., Klippel K.F. (1988).Immunotherapy in bladder cancer with Keyhole-limpet Hemocyanin: A ramdomized study. J. Urology 139: 723 - 726.

Jurincic C. D., Gallati H., Alvarez-Mon M., Sippel J., Carbarillo J., Klippel K. P. (1995). Urinary interleukin-1 alpha levels are increased by intravesical instillation with keyhole limpet hemocyanin in patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Eur. Urol. 28: 334 – 339.

Jurincic C. D., Metz K. A., Beuth J., Sippel J., Klippel K. P. (1995). Effect of keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bacillus Calmete-Guérin (BCG) instillation on carcinoma in situ of the urinary bladder. Anticancer Res. 15: 2771 – 2776.

Jurincic C. D., Von der Kammer H., Beuth J., Scheit K. H., Klippel K. P. (1996). Antibody response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) treatment

in patients with superficial bladder carcinoma. Anticancer Res. 16: 2105 – 2110.

Köhler G., Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495.- 498.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 689 - 685.

Lamm D.L., Thor D.E., Winters W., Stogdill V.D., Radwin H.M. (1981) BCG immunotherapy of bladder cancer: Inhibition of tumor recurrence and associated immune responses. Cancer 48: 82 - 88.

Lamm D.L., Reichert D.F., Harris S.C., Lucio R.M. (1982). Immunotherapy of murine transitional cell carcinoma. J. Urology 128: 1104 - 1108.

Lamm D.L., Stogdill V.D., Stogdill B.J., Crispen R.G. (1986). Complications of bacillus calmette-guerin immunotherapy in 1.278 patients with bladder cancer. J. Urology 135: 272 - 274.

Lamm D.L., DeHaven J.I., Riggs D.L., Ebert R.F. (1993). Immunotherapy of murine bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin (KLH).J. Urol. 149: 648 - 652.

Lamy J., Leclerc M., Sizaret P., Lamy J., Miller K.I., McParland R., Holde K.E. (1987). Octopus doflenini hemocyanin: Structure of the seven-domain polypeptide chain. Biochemistry 26: 3509 - 3518.

Moltó L.M., Carballido J., Jurincic C., Lapena P., Manzano L., Salmeron I., Klippel K.F. (1991). Keyhole limpet hemocyanine can enhance the natural killer activity of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. Eur. Urol. 19: 74.

Morales A., Eidinger D., Bruce A. W. . (1976). ntracavitary *Bacillus Calmette-Guérin* in the treatmen of superficial bladder tumors. J. Urol. 116: 180

Morales A., Ottenhof P., Emerson L. (1981). Treatmen of residual noninfiltrating bladder cancer with *Bacillus Calmette-Guérin . J. Urol. 125: 649.*

Nailor P.H., Sztein M.B., Wada S., Maurer S., Holteman D., Kirkley J.E., Naylor C.W., Zook B.C., Hitzelberg R.A. (1991). Preclinical and clinical studies on immunogenicity and safety of the HIV-1 p17 based synthetic

peptides. AIDS vaccine HPG-30-KLH. Int. J. Immunopharmacology 13: 117 - 127.

Oliva D., Castilla J. C. (1992). Guía para el reconocimiento y morfometría de diez especies del género *Fissurella bruguire*, 1789 (Molusca: Gastropoda) comunes en la pesquería y conchales indígenas de Chile central y sur. Gayana Zool. 56: 77 – 108.

Olusi S. O., Elegbe R. A. (1977). Immunogenicity of haemocyanins from the giant African snail /Achatina fulica) and the keyhole limpet (Megathura crenulata). Comp. Biochem. Phisiol. 56: 289 – 291.

Orlova E.V., Dube P., Harris J.R., Beckman E., Zemlin F., Markl J., Van Heel M. (1997). Structure of Keyhole Limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15A° resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. J. Mol. Biol. 271: 417 - 437.

Olsson C.A., Chute R., Rao C.N. (1974). Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. J. Urology 111: 173 - 176.

Pang A.S.D., Morales, A. (1982). Immunoprophylaxis of a murine bladder cancer with high dose BCG immunizations. J. Urology 127: 1006 - 1009.

Salvato B., Ghiretti-Magaldi A., Ghiretti F. (1979). Hemocyanin of Octopus vulgaris. The molecular weight of the minimal functional subunit in 3 M urea. Biochemistry 18: 2731 - 2736.

Shapiro, A., Ratliff L.T., Oakley D.M., Catalona W.J. (1983). Reduction of bladder tumor growth in mice treated with intravesical bacillus Calmete-Guérin viability and natural Killer cell activity. Cancer Res. 43: 1611 - 1615.

Söhngen S.M., Stahlman A., Harris J.B., Müller S.A., Engel A., Markl J. (1997). Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH). Eur. J. Biochem. 248: 602 - 614.

Swerdlow R.D., Ratliff T., La Regina M., Ritchey J.K., Ebert R.F. (1994). Immunotherapy with Keyhole Limpet Heocyanin: Efficacy and safety in the MB-49 intravesical murine bladder tumor model. J. Urology 151: 1718 - 1722.

Swerdlow R. D., Ebert R. F., Bonaventura C., Miller K. I. (1996). Keyhole limpet hemocyanin: Structural and functional characterization of two

different subunits and multimers. Comp. Biochem. Physiol B Biochem Mol. Biol. 113: 537 – 548.

Van Holde K.E., Miller K.I. (1995). Hemocyanins. En: Advances in Protein Chemistry 47: 1 - 81. Academic Press Inc, New York.

Weigle W. O. (1964). Immunochemical properties of Hemocyanin. Immunochem. 1: 295-302.

Wishahi M., Ismail M.H., Ruebben H., Otto T. (1995). Keyhole-Limpet hemocyanin immunotherapy in the bilharzial bladder: A new treatment modality phase II trial: superficial bladder cancer. J. Urology 153: 926 - 928.

Yacyshyn M.B., Poppema S., Berg A., Mac Lean G.D., Reddish M.A., ;eikle A. (1995). CD69+ and HLA-DR+ activations antigenson peripheral blood limphocite populations in metastatic breast and ovarian cancer patients: correlation with survival following active immunotherapy. Int. J. Cacer 61: 470 - 474.

Yelton D. E., Scharff M. D. (1981). Monoclonal antibodies. Apower-full new tools in biology and medicine. Ann. Rev. Biochen. 50: 657 - 664.

(ANEXO N° 1)

RESÚMEN DE ACTIVIDADES DESARROLLADAS
PROYECTO DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA

FECHA	10-Agosto 1999

1.- ANTECEDENTES GENERALES

CÓDIGO PROYECTO	98-1392
TÍTULO DEL PROYECTO	PRODUCCION DE HEMOCIANINA DE LOCO (*Concholepas concholepas*) PARA SER UTILIZADA COMO TRANSPORTADOR PARA PRODUCIR ANTICUERPOS.
EMPRESA	BIOSONDA S.A.
INFORME DE AVANCE N°	Final
TOTAL INFORMES AVANCE	2

2.- CUADRO RESUMEN DE ACTIVIDADES

2.1.- ACTIVIDADES PROGRAMADAS (Según Carta Gantt)

1. Establecer una red confiable y eficiente de proveedores de locos
2. Establecer las condiciones óptimas de extracción de hemocianina
3. Establecer los parámetros para estandarizar la purificación de hemocianina
4. Desarrollar las tres formulaciones principales de hemocianina (solución, liofilizado y precipitado con sulfato de amonio)
5. Estudios de estabilidad de la materia prima y productos terminados

2.2.- ACTIVIDADES EFECTIVAMENTE DESARROLLADAS

Se cumplieron todos las actividades planificadas del proyecto.

FONDO NACIONAL DE DESARROLLO TECNOLÓGICO Y PRODUCTIVO
FONTEC - CORFO

ANEXO N° 2

CONTROL DE AVANCE FINANCIERO
PROYECTOS DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA

1.- DATOS GENERALES

Título del Proyecto	PRODUCCION DE HEMOCIANINA DE LOCO (*Concholepas concholepas*) PARA SER UTILIZADA COMO TRANSPORTADOR PARA PRODUCIR ANTICUERPOS
Total de Informes	2
Informe a Revisar	Final

2.- RESÚMEN AVANCE FINANCIERO

COSTOS	COSTOS PROGRAMADOS MILES ($)	COSTOS REALES MILES ($)
- Personal de Investigación	11.660	11.633
- Personal de Apoyo	945	350
- Servicios, Mat. y Otros	6.625	7.856
- Uso de Bienes de Capital	4.000	4.000
- Adq. de Bienes de Capital	—	—

FONDO NACIONAL DE DESARROLLO TECNOLÓGICO Y PRODUCTIVO
FONTEC - CORFO

3.- DETALLE DE GASTOS

Personal de Investigación	Gastos ($)
-MARIA INES BECKER	3.573
-ALFREDO DE IOANNES	3.000
-PABLO DE IOANNES	5.060
Total Parcial (1)	11.633
Total Acumulado (2)	11.633

Personal de Apoyo	Gastos ($)
-JORGE VALLEJOS	100
-ANGELINA CASTELLI	100
-TERESA RODRIGUEZ	70
-JOSE PEÑA	80
Total Parcial (1)	380
Total Acumulado (2)	11.983

Servicios Mat. y Otros	Gastos ($)
Reactivos Químicos	3.919
Reactivos Inmunológicos	2.137
Material de Vidrio	211
Material Plástico	38
Computación	470
Animales	137
Contratación de servicios	836
Total Parcial (1)	7.856
Total Acumulado (2)	19.839

Uso de Bienes de Capital	Gastos ($)
Uso de instalaciones generales de laboratorio, oficinas y vivero de animales	4.000
Total Parcial (1)	4.000
Total Acumulado (2)	23.839

Adq. de Bienes de Capital	Gastos ($)
No están contemplados en este proyecto.	
Total Parcial (1)	
Total Acumulado (2)	

Nota:
Total Parcial (1): Gastos correspondientes a la etapa que se informa del proyecto
Total Acumulado (2): Gastos acumulados a la fecha

FONDO NACIONAL DE DESARROLLO TECNOLÓGICO Y PRODUCTIVO
FONTEC - CORFO

2.3.- Comentarios (USO EXCLUSIVO FONTEC)

ALFREDO E. DE IOANNES
Representante Legal
Empresa

PATRICIA CAMPOS
Contador
Empresa

SERGIO MORALES
Ejecutivo de Proyectos
FONTEC

10 de Agosto de 1999

BIOSONDA S.A.
BIOTECNOLOGIA

La información que respalda la presente rendición se encuentra disponible en el Departamento de Contabilidad de la empresa para cualquier consulta o revisión por parte de FONTEC u otro organismo fiscalizador.
Declaro bajo juramento que los datos contenidos en esta Declaración de Gastos son verídicos. Asimismo, declaro conocer las disposiciones relativas a sanciones en caso de suministrar informaciones incompletas, falsas o erróneas.

CORFO

FONTEC

(ANEXO N° 3)

IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

CÓDIGO DEL PROYECTO	98-1392
TÍTULO DEL PROYECTO	**PRODUCCION DE HEMOCIANINA DE LOCO (*Concholepas concholepas*) PARA SER UTILIZADA COMO TRANSPORTADOR PARA PRODUCIR ANTICUERPOS**
EMPRESA	BIOSONDA S.A.

IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO
(Señalar los principales resultados obtenidos en el proyecto y las acciones que se desarrollarán para implementarlo productivamente)

Entre los principales resultados del proyecto, se puede destacar que: **1.** Se estableció una red confiable de proveedores de locos de óptima calidad; **2.** Se establecieron los principales parámetros experimentales para obtener un crudo de hemocianina altamente concentrado y con un bajo contenido de microorganismos; **3.** Se estableció un procedimiento reproducible y confiable para obtener una preparación de hemocianina de alta pureza y con un bajo contenido de LPS; **4.** Se desarrollaron las principales formulaciones de hemocianina; **5.** Se establecieron los principales parámetros del control de calidad de la materia prima y de los productos terminados; **6.** Se iniciaron los estudios de estabilidad del crudo de hemolinfa y de los productos terminados y 7. Se estableció un procedimiento general para pasar de una producción artesanal de homocianina (100 locos) a una semi-industrial (1.000 locos).

Desde el punto de vista productivo, el gran éxito logrado en este proyecto se refleja en que exportaciones a dos de las principales firmas norteamericanas (Pierce Chemical Company y Calbiochem), distribuidoras de insumos y reactivos para investigación, quienes han colocado en sus catálogos nuestro producto, denominado comercialmente *Blue Carrier.* Además, se realizó otra exportación del producto a otra firma norteamericana (Santa Cruz Biotechnology) líder en la producción y comercialización de anticuerpos para investigación biomédica y diagnóstico clínico, quienes la utilizan para desarrollar sus anticuerpos policlonales y monoclonales.

Se espera en el mediano plazo, completar los estudios básicos relacionados con el uso potencial de esta proteína en la terapia del cáncer de vejiga en humanos, para ampliar y potenciar su uso a nivel farmacológico en humanos y dándole de esta forma, mayor valor agregado, del que ya tiene, a esta proteína.

9. ANEXO 1

PUBLICACIONES EN REVISTAS Y PERIODICOS LOCALES SOBRE LAS PRIMERAS EXPORTACIONES DE HEMOCIANINA DE LOCO

Innovadora iniciativa de científicos nacionales

Locos chilenos ayudan a combatir el cáncer

● Matrimonio de investigadores extrae de este molusco una sustancia que estimula las defensas, ataca tumores malignos y podría prevenir el Sida. Primeras partidas del producto ya se enviaron a laboratorios extranjeros.

Pocos saben que el loco, además de ser uno de nuestro productos del mar más apetecidos, tiene una rara particularidad. Su sangre contiene la proteína de mayor tamaño que existe en la naturaleza: la hemocianina, una valiosa sustancia usada por compañías de biotecnología, y que ahora comenzó a ser exportada por una pareja de científicos chilenos.

La hemocianina es el equivalente en los humanos a la hemoglobina; es decir, su función es transportar el oxígeno de la sangre. Se trata de una materia prima esencial para los laboratorios de investigación en el mundo. Además, también se la está empleando para tratar los tumores de vejigas y para crear vacunas experimentales contra el Sida y algunos tipos de cáncer.

"Hasta ahora, la única fuente en el mundo de esta sustancia era una lapa californiana, que por su sobreexplotación es bastante escasa", explica la doctora en biología María Inés Becker, quien realizó la investigación junto a su marido Alfredo De Ioannes.

DE QUINTAY AL MUNDO

Después de estudiar en Estados Unidos, De Ioannes regresó a nuestro país y se enfrentó a la necesidad de contar con hemocianina para realizar sus trabajos.

Se le ocurrió investigar qué pasaba con el loco, un pariente cercano de la lapa californiana. Comprobó que también producía esta sustancia y junto a su esposa inventó una tecnología para extraerla, que está en proceso de patente y por eso mantienen en reserva.

Hoy, la dupla de científicos-empresarios trabaja con el sindicato de pescadores artesanales de Quintay, que tiene un programa de manejo del loco. Ellos los proveen de los moluscos, que viajan hasta un laboratorio en Santiago donde se les extrae la valiosa proteína.

Todos estos esfuerzos ya han dado resultados, pues hace unas semanas se realizaron las primeras exportaciones a Estados Unidos por un monto de 15 mil dólares. Cada gramo de hemocianina chilena se vendió a un precio de 100 dólares, bastante más económico que su competidora californiana.

● El loco contiene hemocianina, la proteína de mayor tamaño en la naturaleza.

"Este nuevo negocio no representa ninguna amenaza para la supervivencia del loco en nuestras costas", aclara De Ioannes. Agrega que las autoridades permiten la extracción anual de ocho millones de unidades a lo largo del país. Para satisfacer toda la demanda mundial de hemocianina, se necesitaría sólo el uno por ciento de esta cantidad.

Esta sustancia extraída del loco ofrece nuevas esperanzas en la lucha contra el Sida y el cáncer.

En la escala evolutiva, los moluscos están muy alejados de los humanos. Por tal motivo, la hemocianina de los locos es fuertemente rechazada por el sistema inmunológico del hombre, estimulando así la fabricación de anticuerpos.

Esta capacidad llamó la atención de muchos científicos, que comenzaron a usar esta sustancia para el tratamiento de tumores de vejiga. Varios laboratorios extranjeros también aprovechan el gran tamaño de la proteína para adherirle otras sustancias y crear potentes compuestos anti Sida.

"Ahora queremos estudiar mejor cuál es la estructura de esta molécula, averiguar qué parte de ella es la que tiene este efecto positivo, para así aplicarla mejor contra el cáncer y en otras posibles terapias"; concluye el matrimonio de científicos.

Gonzalo Argandoña Lazo

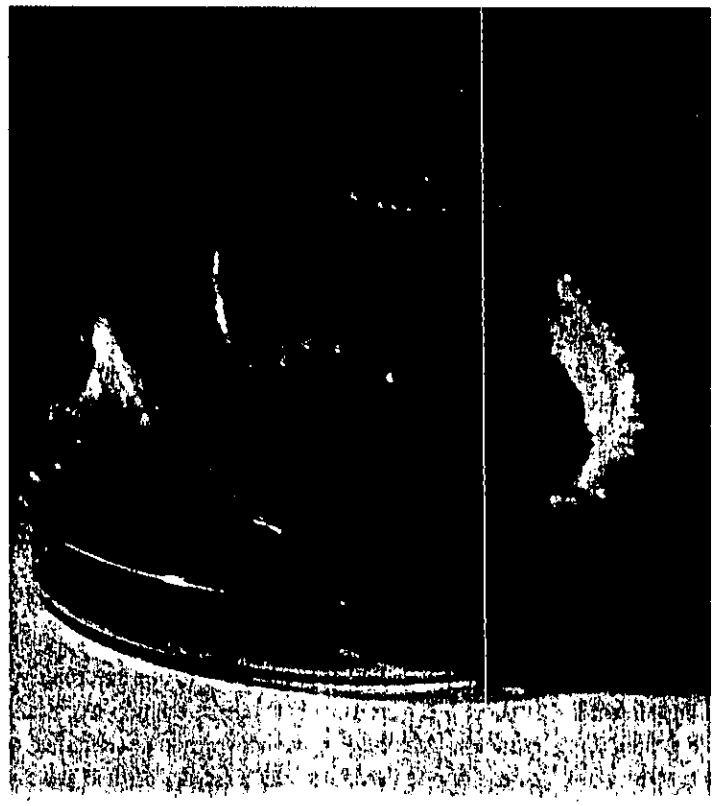
Bits:

HEMOCIANINA DE LOCO

PROTEINA DE MOLUSCO CONTRA EL CANCER

Bajo el nombre de Blue Carrier, una valiosa sustancia extraída de la linfa del loco –el apetecido molusco de nuestro mar– comenzó a ser exportada a laboratorios de Estados Unidos por la empresa Biosonda, formada por los científicos Alfredo de Ioannes y María Inés Becker, expertos en biotecnología. Se trata de la hemocianina, una proteína que transporta el oxígeno en el loco y que se utiliza para estimular la producción de anticuerpos en experimentos para combatir el cáncer de vejiga en humanos y elaborar vacunas contra el Sida.

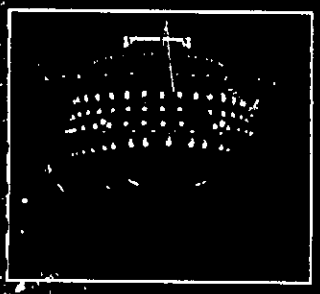
Los biotecnólogos se plantearon el desafío de obtener la hemocianina ante la escasez del producto, que hasta ahora sólo se extraía de la lapa californiana. El proyecto lo llevaron a cabo gracias al financiamiento del Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Productivo (Fontec) de la Corfo.



En Chile se está extrayendo la proteína que sirve de materia prima en la elaboración de nuevas armas para defender la salud humana.

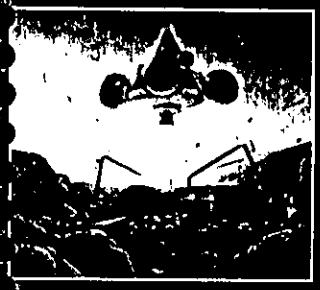
MUY INTERESANTE
OTRA FORMA DE VER

EXCLUSIVA
Ya se fabrican órganos de carne y hueso



GRAND PRINCESS
El crucero más lujoso del mundo

Y ADEMÁS:
- La ciudad de oro africana
- Historia de Siria desde el aire
- Así soy... y así quiero (y puedo) ser



ESPACIO
Próxima parada, planeta Marte

NÚMERO 141 / ABRIL 1999 / $ 1.900

Sucede en Chile

EXPORTAN HEMOCIANINA DE LOCO

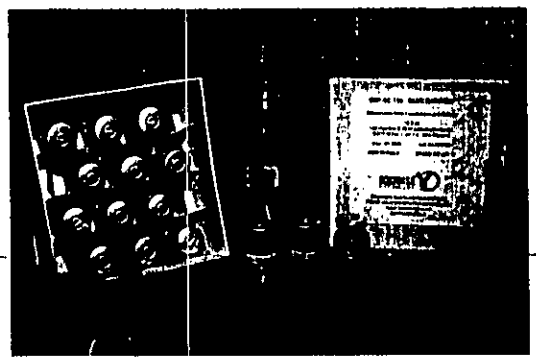
Obtenida y elaborada en forma pionera en Chile, se usa para la producción de anticuerpos a la formulación de vacunas contra el SIDA

El matrimonio de científicos constituido por Alfredo De Ioannes y María Inés Becker, con el apoyo de FONTEC, culminó con éxito el desarrollo de una valiosa sustancia para la investigación y terapia médica: la hemocianina de loco.

Esta es una proteína encargada del transporte de oxígeno utilizada para inducir la producción de anticuerpos en animales de experimentación, como inmunoestimulante en la terapia del cáncer y en la formulación de vacunas contra el SIDA. Hasta ahora era extraída de la lapa californiana, pero su sobreexplotación afectó su producción.

Extraer la sustancia del loco nacional como alternativa tuvo tal éxito que ya se exportaron a EE.UU. 150 grs. de "Blue Carrier", como fue bautizado por su intenso color azul. Según sus creadores, la producción de esta hemocianina no aumentará peligrosamente la explotación del loco, ya que sólo requiere el uno por ciento de la producción nacional del molusco.

Pero el trabajo no se detiene aquí. A la producción del Blue Carrier sigue ahora una investigación que pretende caracterizar la molécula de hemocianina y conocer los mecanismos a través de los cuales induce inmunidad. Las proyecciones de este estudio son de incalculable valor especialmente para el combate del cáncer y el SIDA.■



Frutos del Ingenio

La creatividad es un poderoso factor para el desarrollo empresarial y, desde diversos ámbitos, en nuestro país se incursiona en campos inexplorados para la introducción de nuevos productos, mejores tecnologías o la explotación de recursos de manera novedosa y con mayor valor agregado.

Por una parte, iniciativas privadas -con el apoyo de organismos como Fontec y la Fundación Chile- han tenido como resultado la creación de interesantes productos, tanto desde el punto de vista de su comercialización en los mercados externos como de los beneficios que introducen. Por otra, están en curso diversos proyectos impulsados por estas instituciones que podrían convertirse en provechosas áreas de negocios en el futuro próximo. Son todos frutos del ingenio.

Aporte de Locos

Las cualidades del apetecido molusco Concholepas, o simplemente "loco", son ampliamente conocidas. Sin embargo, lo que muy pocos saben todavía es que los beneficios de este recurso no sólo van por el lado culinario. En efecto, este molusco posee cualidades que podrían beneficiar la salud de los seres humanos.

Este aporte medicinal se basa en que el loco entrega una sustancia llamada hemocianina, de color azul, que es la encargada del transporte de oxígeno en los moluscos y los invertebrados. La proteína equivale a la hemoglobina de los vertebrados, que actúa como un potente agente inmunológico, capaz de crear una bomba productora de anticuerpos.

Esta característica de la hemocianina de producir anticuerpos monoclonales y policlonales contra diferentes antígenos es fundamental para la investigación y el diagnóstico clínico del paciente.

Básicamente, éstos se utilizan como moléculas transportadoras de antígenos pequeños, que por sí solos no son capaces de inducir una respuesta inmunológica. Pero cuando las moléculas se unen químicamente a la hemocianina, el ser vivo responde inmunológicamente, por eso, se dice que la hemocianina es un transportador o "carrier".

La idea de producir esta sustancia a partir de los locos surgió en el año 1992, cuando Alfredo De Ioannes y María Inés Becker, matrimonio de científicos, fundaron Biosonda S.A. En sus investigaciones se descubrió que el loco también producía un tipo de hemocianina, y se decidió purificar el recurso en las instalaciones de la empresa. "Nuestro producto tiene un alto grado de pureza y homogeneidad, además de un bajo contenido de lipopolisacárido (LPS). Esto último significa que durante el proceso de producción prácticamente no se contamina con bacterias", explica. El monto de inversión inicial del proyecto fue de US$ 100.000, de los cuales un 50% los aportó Biosonda y el otro 50% el Fontec.

Cabe señalar que hasta el momento la hemocianina se extrae de una lapa -Keyhole Limpet (volcán de mar o KLH)- que se encuentra en las costas californianas del hemisferio norte. El precio de esta hemocianina llega a US$ 350 por gramo, bastante más que el monto en que se vende la chilena -US$ 100 los cien gramos-, por lo cual se visualizan promisorias perspectivas.

De hecho, ya se exportó una primera partida del producto a Estados Unidos, por un monto de US$ 15.000. Las empresas que lo han adquirido son Pierce Chemical Company (EE.UU.), compañía muy importante en la investigación en el área de inmunología, y Santa Cruz Biotechnology, líder en la producción y comercialización de anticuerpos policlonales y monoclonales para la investigación biomédica en ese país.

La hemocianina, presente en el loco, actúa como un potente agente inmunológico y podría ayudar a combatir enfermedades como el cáncer y el Sida.

Paralelamente, en Chile se están estudiando las cualidades del compuesto con el apoyo del Fondecyt. "Esperamos que este conocimiento nos permita estudiar su aplicación en algunos tipos de cáncer e incluso en el Sida", señala Becker.

Asimismo, se está analizando la aplicación en la formulación de vacunas para animales de interés comercial que sufren algunas patologías hasta ahora sin posibilidades de recuperación, lo cual se traduce en importantes pérdidas, como es el caso de algunas enfermedades de salmones.

CIENCIA Y TECNOLOGIA

PROYECTOS FONTEC Y FONDECYT:

Científicos Chilenos Dan un Alto Valor Agregado a Locos

● Al igual que en las lapas californianas, en los locos de las costas chilenas se halla una compleja proteína capaz de inducir una potente respuesta del sistema inmunológico en los mamíferos. Comenzó su comercialización con el sello nacional. Uso potencial para terapias contra el Sida y algunos cánceres.

Ahora que se levantó la veda de locos en la X Región del país, se podrá consumir este sabroso molusco, prácticamente exclusivo de las costas chilenas. Pero nadie imaginará que en ese mismo plato existen grandes cantidades de una prometedora proteína que ya está siendo usada para abordar la terapia de tumores recurrentes de la vejiga y, a la vez, para formular vacunas experimentales contra el Sida y ciertos cánceres humanos, como el melanoma maligno de la piel y el de mamas.

Este animal marino contiene la proteína más grande que se conoce hasta ahora en la naturaleza, la llamada hemocianina. Esta pesada molécula de los invertebrados es la equivalente a la hemoglobina de los vertebrados, es decir, en ambos casos su rol es transportar el oxígeno de la sangre. Si bien está presente en moluscos y artrópodos (insectos y crustáceos), hasta hace poco se la extraía sólo de las lapas californianas, con un importante mercado internacional en el área de la biomedicina.

Sin embargo, en este presente escenario la hemocianina obtenida de los locos chilenos parece desplazar a su competencia. A través de un proyecto del Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Productivo (Fontec, de Corfo), se consiguió su elaboración a escala industrial, lo que se tradujo en la reciente exportación de 150 gramos del producto —por un valor de 15 mil dólares— a dos firmas de Estados Unidos, una biotecnológica y otra distribuidora de insumos de investigación. El costo total de la iniciativa fue de alrededor de 100 mil dólares.

LA INICIATIVA

Los investigadores detrás de este cautivante trabajo son los doctores Alfredo De Ionannes y María Inés Becker, una pareja de científicos chilenos que busca mayores proyecciones de la ciencia en nuestro país. Para ello, se movieron como muchos de sus pares también lo hacen en los países desarrollados: mientras él se desempeña como académico en la Universidad Católica de Chile, paralelamente mantiene junto a su señora una empresa biotecnológica, cual fue la contraparte del proyecto.

De esta manera, se está abriendo un vasto campo para una nueva exportación no tradicional chilena, con un alto valor agregado y desarrollada con talento y recursos nacionales. 'Sin los aportes públicos nada de esto habría sido realidad', expresan los investigadores entrevistados por El Mercurio. Tienen 5 hijos, y su más importante capital es el quehacer científico.

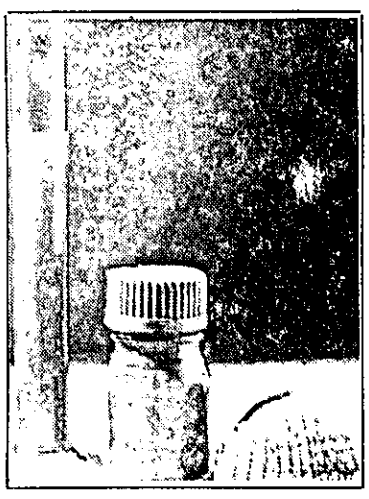
Consultados acerca de la probable sobreexplotación del loco, dijeron que ello no constituye ninguna amenaza, dado que la cantidad de hemocianina que contiene cada molusco es enorme. Explican que con el 1% de la producción chilena se podría abastecer el 50% del mercado actual de dicha proteína. Incluso, señalan que a futuro se podría "ordeñar" a los locos habilitados en un acuario; o sea, cada cierto tiempo extraer de ellos el producto de su sangre (en rigor, de su linfa).

La hemocianina en cuestión posee una gran lejanía evolutiva con los mamíferos (entre los cuales se incluye el hombre) y, por lo mismo, es fuertemente rechazada por el sistema inmunológico de éstos y sirve entonces como potente estimulante en la producción de anticuerpos. Asimismo, debido a su gran tamaño y capacidad estructural para acoplar otras proteínas o algunas partes que la componen, la hemocianina también actúa como transportadora de antígenos selectivos que, por sí solos, no iniciarían respuestas de defensa en el organismo.

Por tales propiedades, es utilizada en la actualidad para frenar el crecimiento de algunos tumores, para detectar la presencia de algunas enfermedades de inmunodeficiencia y, aunque todavía en etapa de experimentación, para ensayar vacunas contra el Sida y algunos cánceres.

La idea de averiguar la presencia de una cantidad significativa y adecuada de hemocianina en los locos surgió con la llegada del doctor De Ionannes al país, luego que él finalizó su especialización en inmunología en la Universidad de California a mediados de los años 70. En sus investigaciones utilizaba rutinariamente la proteína en cuestión, pero aquella proveniente de las lapas (Keyhole limper), conocida como KLH por el nombre de la especie. Su precio era alto, y simplemente la requería para continuar con sus trabajos.

Al poco tiempo, logró purificar la hemocianina del recurso marino chileno, incluso proveer este producto a universidades y laboratorios nacionales. Pero los procedimientos



eran todavía artesanales y la cantidad alcanzada escasa, lo que motivo finalmente a los científicos a postular al proyecto Fontec. A la fecha, se inicia con éxito la fase industrial y con perspectivas de ingresar al mercado europeo a través de EuroChile. Para ellos, el desafío recién comienza.

'SANGRE AZUL'

Es así como la hemocianina obtenida del loco (Concholepas concholepas) aparece como producto chileno en los catálogos de las grandes empresas biomédicas del mundo con el nombre de "Blue Carrier". Recibe tal denominación por su facultad de transportar antígenos y por su coloración azul intenso, pues, a diferencia de la hemoglobina que contiene fierro, la hemocianina cumple su papel de oxigenación en los invertebrados mediante el cobre, formando óxidos de este metal. Por eso, este grupo de seres vivos no tiene sangre roja, sino azul.

La principal ventaja comparativa de la hemocianina del loco chileno es haber alcanzado un menor costo a raíz de una producción ingeniosa y expender el producto bajo su forma altamente soluble y estable en vez de en polvo. Tal cosa implica para las firmas usuarias estimar con exactitud la cantidad real del antígeno que se unirá a dicha proteína para provocar una determinada respuesta inmunológica. Además, la calidad del producto puede ser advertida a simple vista, porque su color azul indicará su conformación óptima (estrechamente acoplada al oxígeno); de lo contrario, exhibirá un color blanco o plomizo.

Por otra parte, los investigadores acaban de adjudicarse un proyecto del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt), a través del cual se espera estudiar la estructura de la hemocianina del loco y entender los mecanismos inmunológicos que induce en los mamíferos.

"Hasta ahora sabemos que esta proteína es levemente diferente respecto a la contenida en la lapa del hemisferio norte, lo que nos llevará a preguntarnos si su capacidad inmunológica es comparativamente igual, mejor o peor. Desde el punto de vista básico, hay mucho que aprender, ya que en la alerta de defensa que propicia no sólo participan anticuerpos (inmunidad humoral), sino también linfocitos T y células asesinas (inmunidad celular)", destacan.

La hemocianina es empleada hoy con éxito para tratar tumores de la vejiga que, pese a su extirpación quirúrgica, crecen nuevamente. Tanto por su eficacia y carencia de efectos colaterales, esta terapia reemplazó a la antes realizada mediante inoculación con la vacuna de la tuberculosis (BCG) a través de la uretra, la que funcionaba como un inmunoestimulante no específico.

Ya en los años 80, se comprobó la notable acción de la hemocianina en pacientes voluntarios que evidenciaron un extraordinario descenso en la recurrencia de estos tumores y sin las complicaciones que revestía el tratamiento anterior, como eran el peligro de someter a las personas con un bacilo atenuado, manifestaciones en el 90% de los casos de una severa cistitis y formación de granulomas en la vejiga, cuya inflamación era en extremo dolorosa.

En cuanto a su uso potencial para el desarrollo de vacunas contra el Sida y algunos cánceres, la estrategia en experimentación es simple. En la primera circunstancia, a la hemocianina se le adosan piezas de proteínas de la cubierta del virus para gatillar la respuesta inmunológica, en tanto que en la segunda se usa la hemocianina como tal o se le agregan algunas moléculas propias del tumor.

Esta investigación de alto nivel es un ejemplo loable que demuestra la utilidad de la ciencia para nuestro país y, sobre todo, la capacidad de sus cultores para vender inteligencia y ventilar el sello nacional en el mercado externo.

Por Lilian Duery A.