

# El caso Biosonda

**Alfredo E De Ioannes**  
**María Inés Becker**





# La misión

---

- Biosonda es una empresa de biotecnología cuyo propósito es desarrollar negocios en el área de la inmunobiotecnología y sondas moleculares
- La empresa se especializa en desarrollar productos inmunoestimulantes, vacunas, sondas para el inmunodiagnóstico y kits para la detección del genoma de patógenos

## El desafío (1993)

---

- Crear una empresa de Biotecnología en un ambiente académico hostil y sin un historial de éxitos que avalen estas iniciativas
- Lograr crédito bancario en un sistema no diseñado para apoyar a empresas pequeñas innovadoras
- Carencia de capital de riesgo estructurado
- Sólo CORFO-FONTEC ofrecía apoyo a empresas emergentes innovadoras

# La estrategia

---

- Se funda la empresa con un capital familiar pequeño aportado por los socios
- Se desarrolla un **ÁREA DE SERVICIOS** que incluye la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales a pedido para el mercado interno
- Se crea el **ÁREA COMERCIAL** e inicia la importación de insumos para investigación biomédica, con el propósito de generar flujos de caja, conocer la demanda de productos en el mercado exterior y poder establecer alianzas con empresas distribuidoras globales
- Se forma el **DEPARTAMENTO I+D**, con el propósito de encontrar productos de rápido desarrollo y alto valor agregado

Produccion de hemocianina de loco *Concholepas concholepas* para ser utilizada como transportador para producir anticuerpos y tratamiento del cáncer

Proyecto CORFO



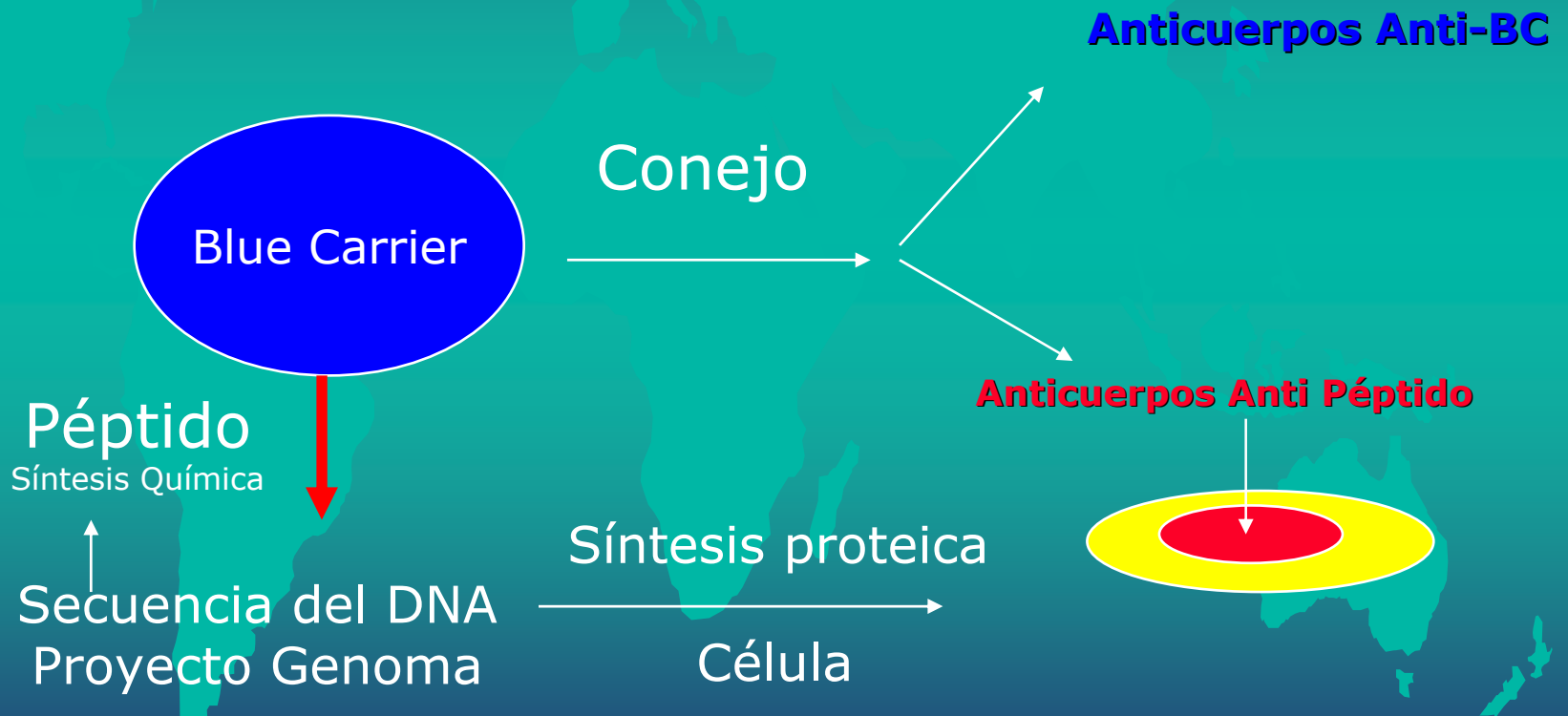


# El Negocio

---

- El análisis del genoma de diferentes especies, ha permitido identificar un gran número de genes con alto potencial en biotecnología
- Para estudiar la expresión de estos genes se requiere de anticuerpos específicos
- La inmunización de animales con péptidos sintetizados de acuerdo a la secuencia del gen putativo, unido a un transportador inmunogénico, permite producir anticuerpos específicos

# Estrategia para producir anticuerpos anti-peptidos





# La demanda de hemocianina ha presionado buscar moléculas con similares propiedades

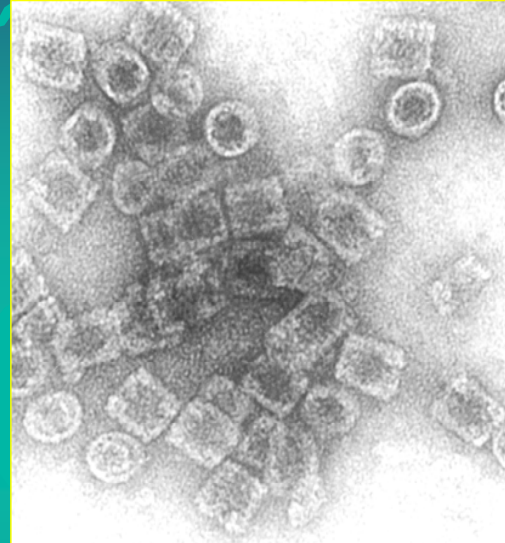
- La hemocianina más utilizada era la proviente del molusco *Megathura crenulata* (Keyhole limpet) que se conoce como **KLH**
- La hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco) un molusco exclusivo de Chile como sustituto de KLH



**Blue Carrier®**

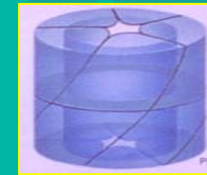
# Propiedades que hacen a la hemocianina muy inmunogénica

## → Tamaño



*Microscopía Electrónica de CCH:  
Tinción negativa*

*Didecámero  
8000 kDa.*



## → Origen filogenético distante de los vertebrados

## → Glicoproteína, con subunidades repetidas

# Usos de las hemocianinas en biomedicina y biotecnología

---

- Antígeno experimental
- Proteína transportadora para haptenos
- Proteína transportadora para vacunas mínimas
- Agente inmunoterapéutico no específico para ciertos cáncer humanos: **Cáncer superficial de vejiga, vacunas dendríticas.**
- Vacunas anticonceptivas de uso veterinario

# Oportunidades

---

- Conocimiento científico
- Extensos recursos marinos chilenos
- Conocimiento de la demanda del mercado
- Recursos humanos altamente calificados
- Fondos para desarrollar el producto
- Fondos para I&D: nuevas aplicaciones

# Objetivos generales del proyecto productivo

---

- **Desarrollar una metodología a gran escala para obtener hemocianina de Loco, con un alto grado de pureza y estabilidad.**
- **Desarrollar las diferentes formulaciones de hemocianina que se comercializan:**
  - ✓ Hemocianina estéril en solución salina
  - ✓ Hemocianina en glicerol
  - ✓ Hemocianina pre-activada en forma de kit
- **Establecer los protocolos de control de calidad de los productos. ISO 9001 en proceso de certificación**

# Ventajas de Blue Carrier

---

- Solubilidad y estabilidad
- Inmunogenicidad
- Excelente para producir anticuerpos contra péptidos fosforilados
- Estructura única de subunidades que le otorga gran estabilidad
- Precios competitivos



# Debilidades de Blue Carrier

---

- Era desconocido hasta fines del siglo pasado
- No existían publicaciones que avalaran su calidad
- No se conocía su estructura de subunidades
- Se desconocía el mecanismo de acción



## Hemocyanin of the Molluscan *Concholepas concholepas* Exhibits an Unusual Heterodecameric Array of Subunits\*

Received for publication, January 28, 2004, and in revised form, April 7, 2004  
Published, JBC Papers in Press, April 8, 2004, DOI 10.1074/jbc.M400903200

Pablo De Ioannes‡, Bruno Moltedo‡, Harold Oliva, Rodrigo Pacheco, Fernando Faunes, Alfredo E. De Ioannes, and María Inés Becker§

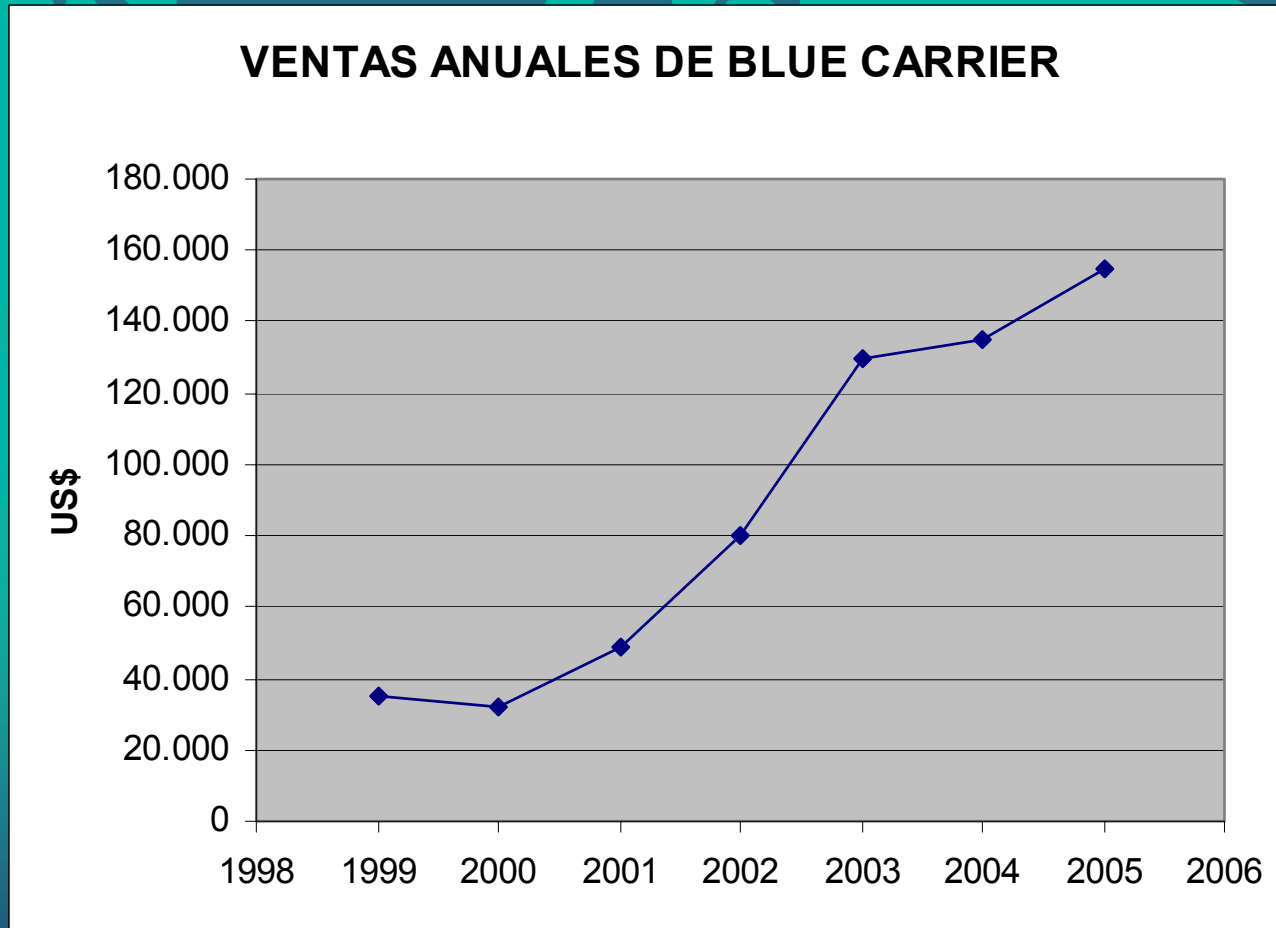
From the Department of Research and Development, BIOSONDA Corp., Avenida Alcalde Eduardo Castillo Velasco 2902, Santiago 7750269, Chile

We describe here the structure of the hemocyanin from the Chilean gastropod *Concholepas concholepas* (CCH), emphasizing some attributes that make it interesting among molluscan hemocyanins. CCH exhibits a predominant didecameric structure as revealed by electron microscopy and a size of 8 MDa by gel filtration, and, in contrast with other mollusc hemocyanins, its stabilization does not require additional  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Mg}^{2+}$  in the medium. Polyacrylamide gel electrophoresis studies, analyses by a MonoQ FPLC column, and Western blots with specific monoclonal antibodies showed that CCH is made by two subunits noncovalently linked, named CCH-A and CCH-B, with molecular masses of 405 and 350 kDa, respectively. Interestingly, one of the subunits undergoes changes within the macromolecule; we demonstrated that CCH-A has an autocleavage site that under reducing conditions is cleaved to yield two polypeptides, CCH-A1 (300 kDa) and CCH-A2 (108 kDa), whereas CCH-B remains unchanged. The CCH-A nick occurs at 4 °C, increases at 37 °C, and is not inhibited by the addition of protease inhibitors and/or divalent cations. Since the CCH structure is a heterodimer, we investigated whether subunits would be either intermingled, forming heterodecamers, or assembled as two homogeneous decamers. Light scattering and electron microscope studies of the *in vitro* reassociation of purified CCH subunits demonstrated that the sole addition of  $\text{Mg}^{2+}$  is needed for its reassembly into the native decameric molecule; no homodecamer reorganization was found with either CCH-A or CCH-B subunits alone. Our evidence showed that *C. concholepas* hemocyanin is an unusual example of heterodecameric organization.

Molluscan hemocyanins assemble into hollow cylindrical layered molecules formed by 10 subunits. Each subunit, ranging from 350 to 450 kDa, includes seven or eight globular folded domains known as functional units (FUs),<sup>1</sup> which are arranged into pearl-like chains and covalently bound by a short flexible linker region of 10–15 amino acid residues. FUs vary in size from 45 to 55 kDa, and each of them is capable of reversibly binding one oxygen molecule through a pair of copper atoms. Decamers reach molecular masses of 3.5–4.5 MDa, and in bivalves and gastropods, they can self-associate as stable dimers. This association occurs due to an asymmetrical face-to-face interaction between decamers, resulting in huge structures, which range from 8 to 9 MDa (3–10).

Profuse experimental studies, using different dissociation and association conditions of the native mollusc hemocyanin (*e.g.* removal of divalent cations (11–14), pH changes, and the addition of denaturing agents (15, 16)), have helped to elucidate its subunit composition and structure. In turn, the uses of immunochemical methods combined with partial proteolytic digestion of the subunits, supported by sequence studies, have allowed researchers to establish structural relationships among different FUs and their location in the polypeptide chain (17–22). Thus, it has been concluded that mollusc hemocyanins varied, both in subunit composition and arrangement (1). Homogeneous decamer and didecamer structures consisting of only one kind of subunit are found in the bivalves of the genus *Yoldia* (23). In contrast, gastropod hemocyanins of *Megathura crenulata* (17, 24), *Haliothis tuberculata* (25, 26), and *Rapana thomasiana* (27) display two distinct homodecameric forms, attributed to the presence of two different subunits. Interestingly, didecameric association occurs exclusively among equivalent decamers, generating two homogeneous hemocyanin isoforms, and hybrid molecules have not been described. Although *Murex fulvescens* hemocyanin has two differ-

# Ventas de Blue Carrier como transportador

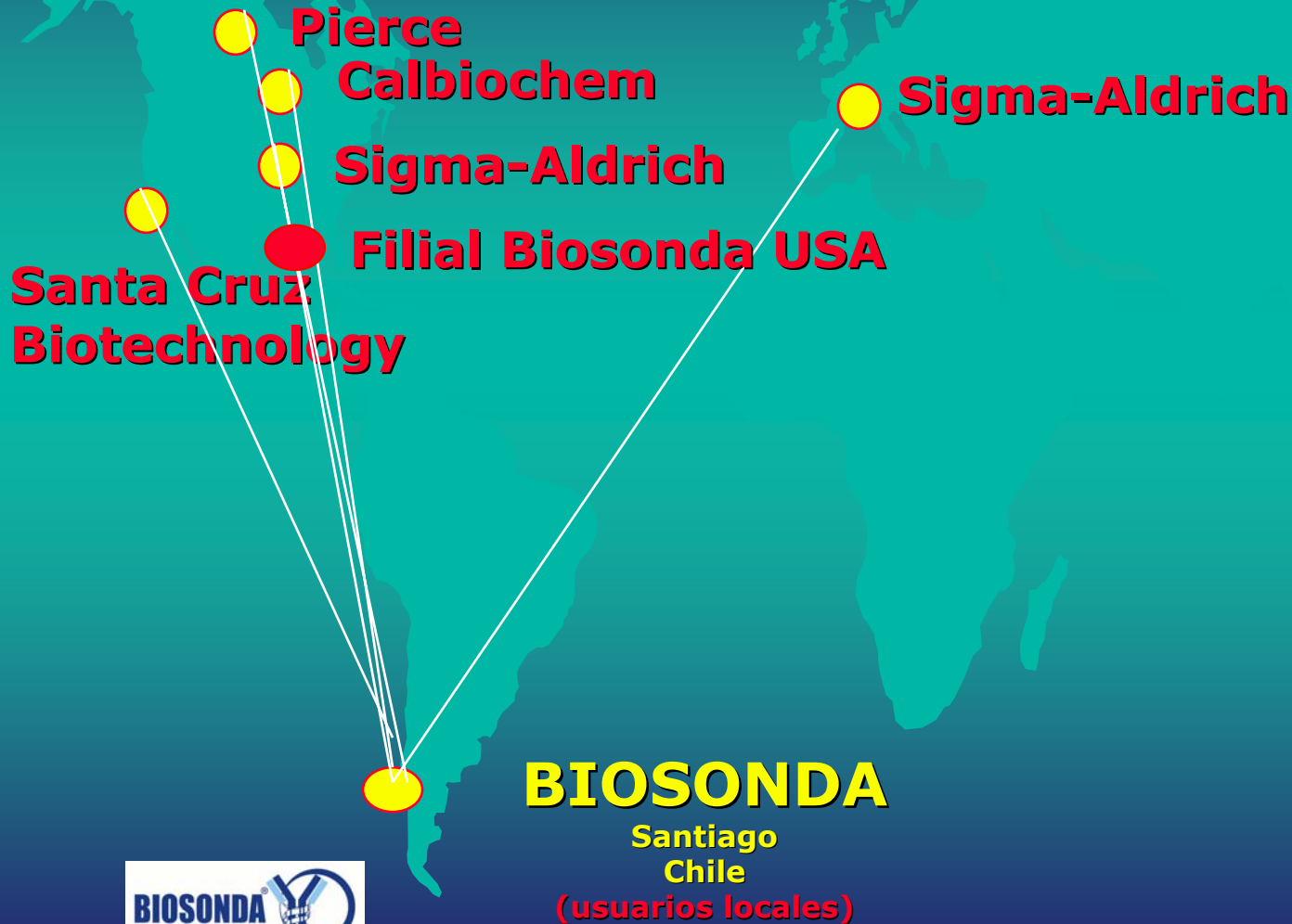


# Desafíos

---

- Se ha logrado una presencia en el mercado global entre el 5-10 % en 5 años, quedan varios segmentos del mercado sin abrir y el crecimiento de las ventas internacionales ha disminuido
- Se observa que hay un nicho de mercado sin explotar que utiliza el carrier pre-activado
- Siendo un producto de confianza, se requiere tener presencia física en el mercado blanco y despejar dudas con respecto a la persistencia del producto a futuro

# Red de distribuidores de Blue Carrier



# EL MERCADO FUTURO DE BLUE CARRIER

TERAPIA ANTI-TUMORAL Y VACUNAS  
ANTI-CONCEPTIVAS

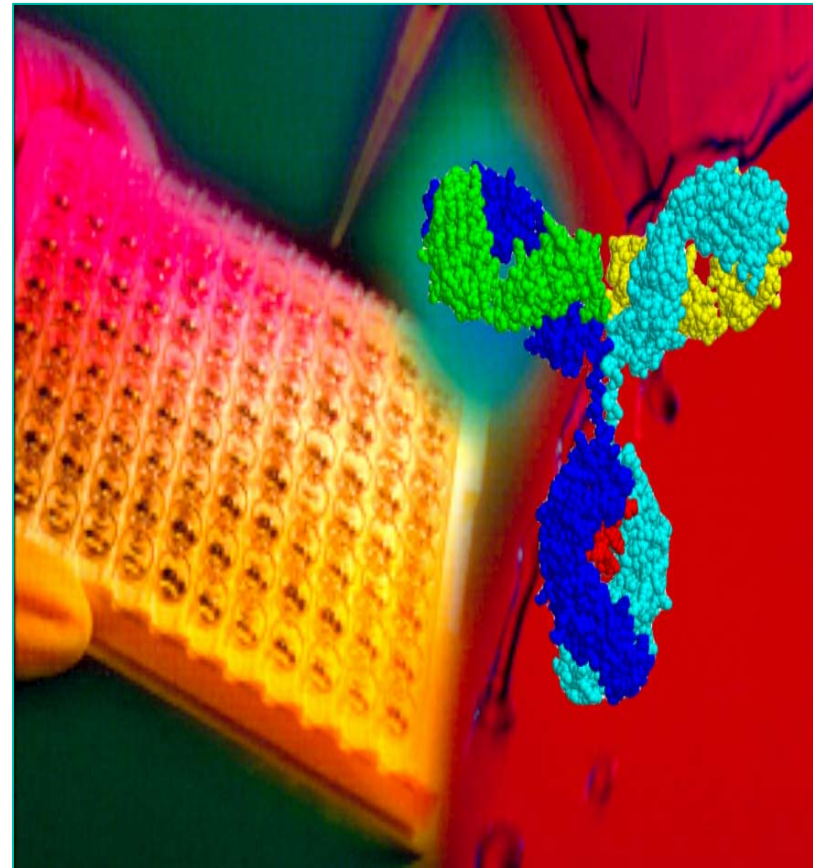




# EFEECTO INMUNOESTIMULANTE DE BLUE CARRIER

---

- ◆ Habíamos demostrado que la hemocianina de loco es un excelente transportador para producir anticuerpos contra péptidos y haptenos, pero.....



# ANTECEDENTES

---

- ◆ En los años 70, Olsson y cols., estudiando el grado de problemas inmunológicos de pacientes con carcinoma de vejiga, analizaron su respuesta de DTH con varios antígenos cutáneos, y entre ellos incluyeron KLH: Demostraron una reducción significativa en la frecuencia de la recurrencia de estos tumores.



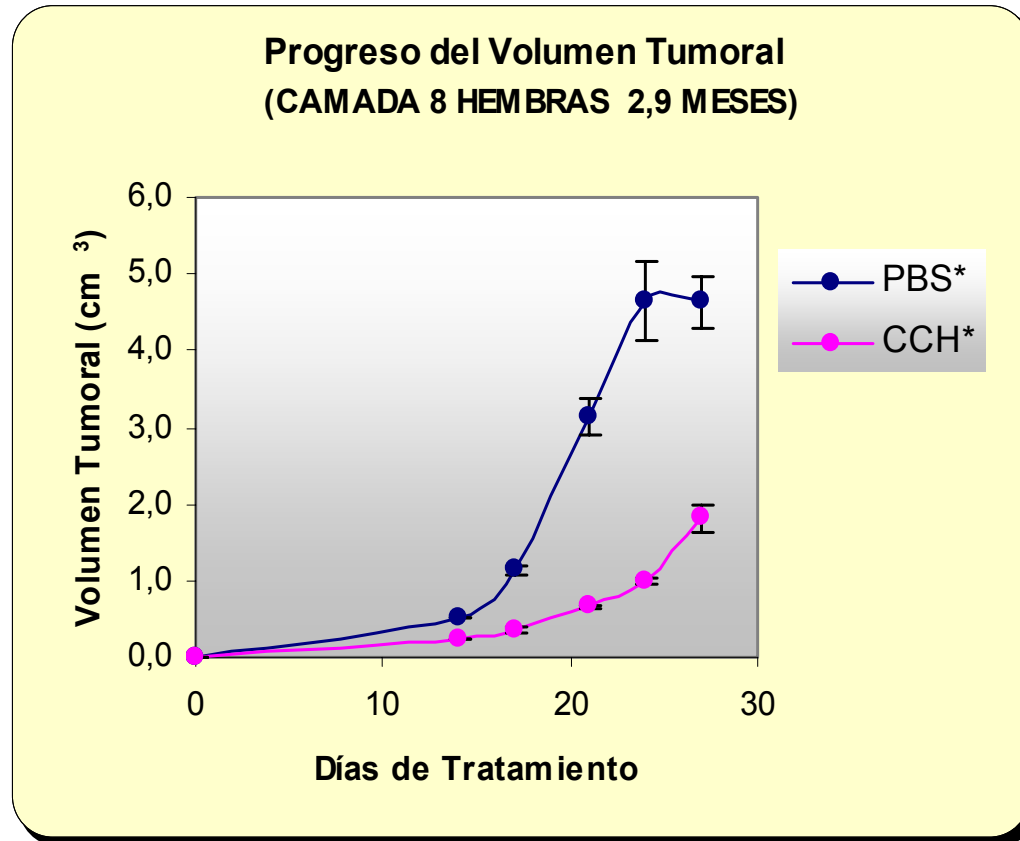
## **Incidencia del cáncer de vejiga**

**4ª Causa de muerte entre los hombres y uno de los 8 tipos de cáncer más común entre las mujeres (5,5% y 2,3%, respectivamente)**

**Tratamiento clásico: vacuna de la tuberculosis (BCG, Bacillus Calmette Guérin)**



# EFECTO DE BLUE CARRIER SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VIVO* DE CELULAS MBT-2 en Ratones C3H/He



# Vacunas anticonceptivas y dendríticas

---

- Biosonda ha establecido un acuerdo comercial con el National Wild Life Research Center de Colorado USA, para que el uso exclusivo de Blue Carrier en el desarrollo de vacunas contraceptivas veterinarias para el control de poblaciones de animales salvajes y domésticos en zonas urbanas y parques nacionales
- Biosonda colabora con la empresa Chilena Oncobiomed en el desarrollo de vacunas dendríticas para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres humanos como melanomas, prostático

# Desafíos del mercado terapéutico

---

- Obtención de subunidades o fragmentos inmunogénicos de hemocianina, mediante DNA recombinante bajo condiciones GMP, proyecto Fundación PUC Copec
- Se requiere internacionalizar Biosonda para lograr que las empresas farmacéuticas elijan Blue Carrier al inicio de los proyectos de I+D
- Establecer una alianzas estratégicas con empresas farmacéuticas para desarrollar los ensayos pre-clínicos y clínicos que permitan el uso de Blue Carrier en la terapia de tumores vesicales y de células dendríticas
- Desarrollar una red global de contactos a nivel de Universidades e Institutos de Investigación

# Patentes y mercados

---

- Se concedió en Chile una patente, que da exclusividad a Biosonda en el uso del recurso natural para obtener hemocianina y protege el método de producción
- En USA se aprobó una patente una patente que protege el uso de las subunidades de hemocianina como inmunógeno y base para desarrollar vacunas. Mediante el protocolo PCT esta patente se ha aplicado en varios países europeos.
- El mercado total de las hemocianinas, incluyendo el veterinario e inmunoterapéutico para las hemocianinas deberían tener un tamaño de al menos 10 millones de dólares anuales

# Resumen

---

- La empresa ha sido capaz de generar flujos de caja que le permiten desarrollar proyectos de I+D financiados fundamentalmente con recursos propios y mediante subvenciones estatales
- Con el apoyo de la Fundación PUC-COPEC se ha comenzado el estudio y clonación de los genes de hemocianina.
- Con la empresa Diagnostec y el apoyo de la Fundación PUC-COPEC se está estudiando la capacidad inmunostimulante de la hemocianina en vacunas veterinarias

# Resumen 2

---

- Mediante alianzas con empresas locales, se ha desarrollado una línea de productos para banco de sangre, que ya se están exportando a países latinoamericanos
- En colaboración con la Universidad Austral de Chile y el financiamiento de FONDEF, se ha desarrollado un kit basado en PCR, que permite detectar el genoma de micobacterias, en animales y en alimentos. Esta línea de productos se ofrece actualmente al mercado local y se han iniciado exportaciones a países latinoamericanos
- Con el financiamiento de FONDEF, se está desarrollando un proyecto con el INIA para producir biológicos de alto valor agregado en la leche de vacas transgénicas