

Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual

MIGUEL DEL CAMPO^{1,a}, SERGIO ARANCIBIA^{1,a}, ESTEBAN NOVA¹,
FABIÁN SALAZAR¹, ANDREA GONZÁLEZ^{1,a},
BRUNO MOLTEDO^{1,b}, PABLO DE IOANNES^{1,b}, JORGE FERREIRA²,
AUGUSTO MANUBENS³, MARÍA INÉS BECKER^{1,3}

Hemocyanins as immunostimulants

Hemocyanins, the giant oxygen transporter glycoproteins of diverse mollusks, are xenogenic to the mammalian immune system and they display a remarkable immunogenicity. Therefore they are ideal non-specific immunostimulants to treat some types of cancer. They are used as an alternative therapy for superficial urinary bladder cancer (SBC), that has been traditionally treated with Bacillus Calmette-Guèrin (BCG). In contrast to BCG, hemocyanins do not cause side-effects, making them ideal for long-term repetitive treatments. Hemocyanins have also been exploited as carriers to develop antibodies against hapten molecules and peptides, as carrier-adjuvants for cutting-edge vaccines against cancer, drug addiction, and infectious diseases and in the diagnosis of parasitic diseases, such as Schistosomiasis. The hemocyanin from Megathura crenulata, also known as keyhole limpet hemocyanin (KLH), has been used for over thirty years for the purposes described above. More recently, hemocyanin from the Chilean mollusk Concholepas concholepas (CCH) has proved to be a reliable alternative to KLH, either as carrier protein, and as a likely alternative for the immunotherapy of SBC. Despite KLH and CCH differ significantly in their origin and structure, we have demonstrated that both hemocyanins stimulate the immune system of mammals in a similar way by inducing a potent Th1-polarized cellular and humoral response.

(Rev Med Chile 2011; 139: 236-246).

Key words: Adjuvants, immunologic; Hemocyanin; Urinary bladder neoplasms.

¹Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Santiago, Chile.

²Laboratorio de Bioenergética, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

³Departamento de Investigación y Desarrollo, Biosonda S.A. Santiago, Chile.

^aEstudiante, Programa de Doctorado en Bioquímica, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^bEstudiante, Programa Doctorado en Ciencias Biomédicas, Escuela de Graduados, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA.

Recibido el 7 de junio de 2010, aceptado el 7 de noviembre de 2010.

Trabajo financiado por Proyectos FONDECYT y Fundación COPEC-UC a M. I. Becker, M. Del Campo, S. Arancibia y A. González son becados CONICYT.

Correspondencia a: María Inés Becker, Ph.D. Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Avenida Alcalde Eduardo Castillo Velasco 2902, Santiago, Chile. Tel: (56-2) 209-6770. E-mail: mariaines.becker@fucited.cl

Las hemocianinas son glicoproteínas que transportan oxígeno en algunos moluscos y artrópodos, fijándolo mediante un grupo prostético que contiene cobre, cuyo estado oxidado les otorga su color azul¹. Al ser inoculadas en mamíferos, las hemocianinas de moluscos inducen una poderosa respuesta inmunológica, efecto atribuido a su origen filogenético lejano, enorme tamaño (4 a 8 MDa), residuos oligosacáridos y estructura cuaternaria con múltiples epítomos repetidos.

Las propiedades inmunoestimulantes de las hemocianinas las han convertido en herramientas de ingente uso en biomedicina². Se utilizan como proteínas transportadoras (*carrier*) para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos, aplicación

creciente en la formulación de vacunas experimentales contra patógenos y cánceres^{3,4}. Además, por sí solas se emplean como inmunoestimulantes no específicos en la terapia del carcinoma superficial de vejiga (CSV) como alternativa al *Bacillus Calmette-Guèrin* (BCG)⁵ y en vacunas de células dendríticas⁶. La hemocianina de la lapa californiana (*Megathura crenulata*) conocida como KLH, por su nombre en inglés *keyhole limpet* ha sido utilizada por más de 30 años con tales propósitos. Su demanda creciente ha afectado su biodisponibilidad, llevando a la búsqueda de nuevas proteínas inmunoestimulantes.

Nuestro grupo descubrió que la hemocianina del molusco loco (*Concholepas concholepas*) denominada CCH, tiene propiedades inmunológicas

comparables a KLH^{7,8}, siendo una buena alternativa como proteína transportadora⁹, en vacunas experimentales¹⁰ y en el tratamiento del CSV¹¹. Aun cuando CCH y KLH difieren en su origen y estructura, el hecho que ambas proteínas induzcan similares respuestas inmunoestimulantes, sugiere que poseen un patrón conservado que sería reconocido por el sistema inmune, estimulando un

mecanismo inmunogénico ancestral presente en los mamíferos.

Estructura de las hemocianinas de moluscos

Por su enorme tamaño, la estructura de las hemocianinas ha sido estudiada por microscopía electrónica de transmisión (Figura 1). Si bien am-

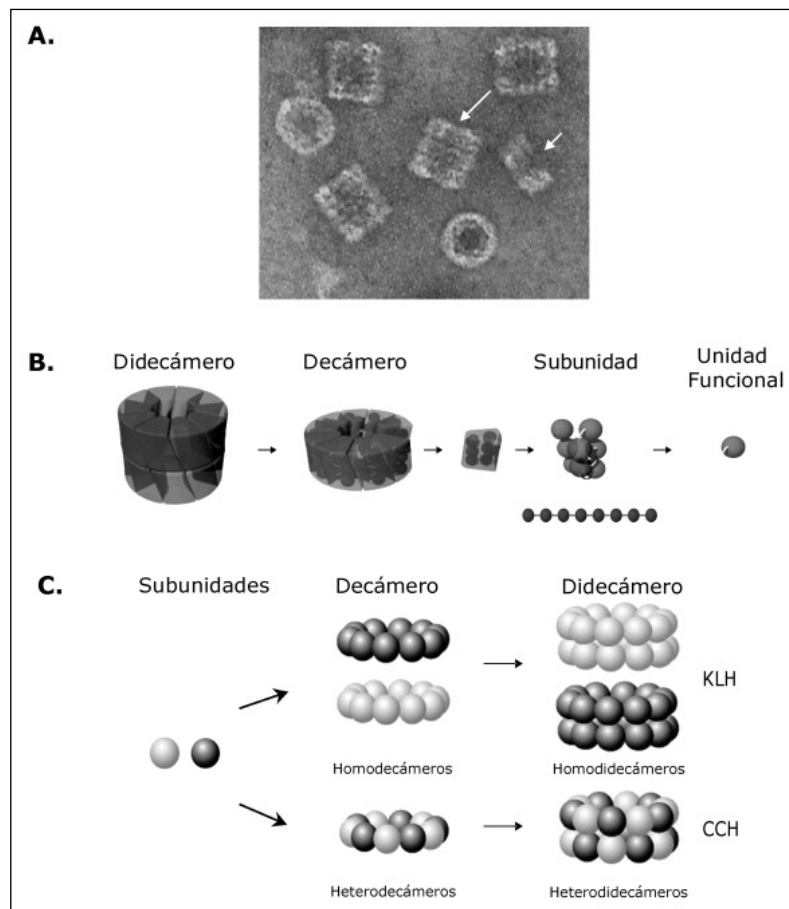


Figura 1. Organización general de las hemocianinas de moluscos gastrópodos. **A.** Microfotografía de hemocianina de *C. concholepas* con tinción negativa mostrando su forma de cilindro hueco (325Å y 392Å, diámetro externo y altura, respectivamente). Los círculos y rectángulos corresponden a vistas de la proteína desde arriba y laterales, respectivamente. Se señala un didecámero (flecha larga) y un decámero (flecha corta). **B.** Esquema de la estructura habitual de oligómero con forma de cilindro hueco de las hemocianinas de moluscos. En gastrópodos, como CCH y KLH, los decámeros [] que corresponden a la estructura básica, formada por la asociación no covalente de 10 subunidades- se asocian de a pares formando didecámeros. Cada subunidad a su vez, está constituida por 8 dominios globulares, unidos entre sí por un péptido espaciador constituido por 10 a 15 residuos de aminoácidos, de manera similar a un collar de perlas; cada uno de estos dominios posee un par de átomos de cobre a los cuales se une en forma reversible una molécula de oxígeno, razón por la cual se les denomina unidades funcionales. **C.** Esquema comparativo de la organización de los dos tipos de subunidades en KLH y CCH, mostrando que a nivel del decámero, KLH es homodécámerica, es decir, que el oligómero está compuesto por 10 subunidades iguales, y a nivel del didecámero, es homodidecamérica. En contraste, en CCH ambas estructuras tienen entremezcladas las dos subunidades (de una manera no dilucidada aún) constituyendo heterodecámeros y consecuentemente, heterodidecámeros.

bas proteínas presentan dos tipos de subunidades, en KLH constituyen homodécámeros que se asocian en pares formando homodidécámeros, cuya estabilidad depende del Ca^{+2} y Mg^{+2} en su medio de mantención¹². En cambio, en CCH, las subunidades están entremezcladas y se organizan como heterodécámeros que a su vez conforman heterodidécámeros, sin la necesidad de iones divalentes, lo cual le confiere mayor estabilidad comparativa frente a KLH^{8,13} (Tabla 1). Sin embargo, KLH y CCH son igualmente inmunogénicas, propiedad que atribuimos a secuencias compartidas en su estructura primaria.

Dadas las proyecciones terapéuticas de estas enormes proteínas, se han iniciado estudios sobre su síntesis¹⁴ y el clonamiento de sus genes³. En el futuro, se podría producir algún dominio recombinante, no sólo de interés inmunológico. Al respecto, se ha caracterizado un fragmento de la hemocianina de caracol marino (*Rapana thomasi*) (RtH) que presenta actividad antimicrobiana, propiciando su utilización como potencial antibiótico¹⁵, mientras que un fragmento de la hemocianina de camarón (*Penaeus vannamei*) ha mostrado poseer actividad antifúngica¹⁶.

Mecanismos de inmunoestimulación

Desde la década de 1960-69, KLH se ha utilizado como antígeno modelo para estudiar las respuestas timo-dependientes mediadas por linfocitos T CD4^+ , caracterizadas por la presencia de IgM en la respuesta primaria e IgG en la secundaria, además de linfocitos de memoria. No obstante, se sabe poco sobre los mecanismos involucrados en su poderosa inmunogenicidad. Considerando que el inicio de una respuesta inmune requiere de señales de peligro o inflamación¹⁷, surge la interrogante de cuáles características estructurales de KLH y CCH *per se* cumplen esta función.

El efecto antitumoral de las hemocianinas en CSV requiere de una sensibilización previa con la proteína, para direccionar así la respuesta inmune hacia la secreción de citoquinas del tipo Th1 (IL2, IL12, $\text{INF}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$) que activan la citotoxicidad mediada por células¹⁸. En este mecanismo, las células dendríticas juegan un rol clave, procesando el antígeno para presentarlo a linfocitos T CD4^+ y, de esta forma, inducir dicha polarización de la respuesta¹⁹. Curiosamente, aunque se ha publicado que KLH induce la maduración de células

dendríticas humanas cultivadas *in vitro*²⁰, estos resultados son controvertidos^{21,22}. Tampoco hay evidencia suficiente usando modelos murinos que permitan comprender cómo KLH y CCH inician la respuesta inmune y las células involucradas. Propusimos que los azúcares podrían participar²³. De hecho, algunos autores atribuyen las propiedades antitumorales de KLH a sus oligosacáridos². Por otra parte, si bien rasgos como el tamaño y la estructura cuaternaria han sido invocados para explicar la inmunogenicidad de estas proteínas, el hecho que las subunidades aisladas de CCH²³ y de RtH²⁴ también sean inmunogénicas *per se*, los descartan, sustentando que la adyuvancia intrínseca de las hemocianinas reside mayoritariamente en su xenogenicidad.

Se ha propuesto que la inmunogenicidad de las hemocianinas podría relacionarse con la existencia de linfocitos B de memoria, generados por una estimulación previa con xenoantígenos similares². Así, los anticuerpos preformados facilitarían su incorporación y procesamiento por células presentadoras de antígeno. Al respecto, células dendríticas derivadas de monocitos de pacientes con melanoma, previamente sometidos a terapia con una vacuna de células dendríticas que contenía KLH, fueron capaces de inducir la proliferación *in vitro* de linfocitos T KLH específicos, encontrándose que la internalización *in vitro* de KLH por las células dendríticas dependía de la presencia del suero de los pacientes en el medio de cultivo. Al bloquear los receptores FcγRII, se inhibió la internalización y presentación de KLH, concluyéndose que esta proteína ingresa en células dendríticas vía receptores FcγRII que unen el fragmento Fc de los anticuerpos anti-KLH, los cuales jugarían un rol en el inicio de la respuesta inmunoestimulante por KLH²⁵. Consecuentemente, si bien la hemocianina no estaría activando a células dendríticas de manera innata, no se puede descartar que otras células presentadoras de antígeno participen en dicha función.

Aplicaciones biomédicas

Las hemocianinas son usadas como transportadoras (“carrier”) para producir anticuerpos y como carrier-adyuvante en vacunas experimentales terapéuticas para cáncer. Entre sus ventajas, además de su costo razonable y la ausencia de efec-

Tabla 1. Comparación del origen filogenético, propiedades estructurales, bioquímicas y lugar de síntesis de CCH y KLH

Propiedades	Parámetro	KLH Hemocianina Keyhole limpet (<i>M. crenulata</i>)	CCH Hemocianina de Loco (<i>C. concholepas</i>)	Referencias
Taxonómicas				
	Phylum, Clase	Mollusca, Gastropoda	Mollusca, Gastropoda	
	Orden	Archaeogastropoda	Neogastropoda	
	Familia	Fissurellidae	Muricidae	
Fisicoquímicas				
Purificación	Procedimiento	Precipitación hemolinfa y centrifugación	Precipitación hemolinfa y centrifugación	1, 2, 8
Estructura	Forma molécula	Cilindro hueco	Cilindro hueco	2, 8
	Tamaño molécula	300 Å Ø y 400 Å largo	325Å Ø y 392Å largo	2, 8
	Masa molecular relativa	~ 8MDa	~ 8MDa	2, 8
	Organización a nivel del decámero ¹	Homogéneo, un solo tipo de subunidad	Heterogéneo, dos tipos subunidades	1, 2, 8
	Organización a nivel del didecámero ²	Homodidecámero	Heterodidecámero	1, 2, 8
	Subunidades	KLH1 y KLH2	CCHA y CCHB	12, 23
	Tamaño subunidad (kDa)	KLH1 390 y KLH2 360	CCHA 404 y CCHB 351	12, 23
	FUs ³ por subunidad	8 FUs cada una	8 FUs cada una	7, 12, 23
	Relación epitópica entre FUs	No comparten epítomos entre sí	Comparten epítomos entre sí	7, 12, 23
Bioquímicas				
	Estabilidad de estructura cuaternaria	Inestable, requiere Ca ⁺² y Mg ⁺²	Estable, no requiere Ca ⁺² y Mg ⁺²	8, 12, 13
	Cobre (%p/p)	0,23	0,23	8, 12
	Carbohidratos (%p/p)	3,2	3,1	2, 23
	Punto isoeléctrico	5,7	6,0	2, 8
	Amino terminal ⁴	KLH1 <u>AGNLVRKSVEHLTQE</u> KLH2 <u>VDTVVRKNVDSL</u>	CCHA <u>LMRKDVDTLTD</u> CCHB <u>LXRKNVD</u>	1, 3, 8
Biosíntesis				
	Lugar involucrado	No identificado	Hepatopáncreas	2, 14
	Tipo celular	Rogocitos del tejido conectivo (no demostrado)	Región acinar	2, 14

^{1,2,3}Para una mejor comprensión véase la Figura 1. ⁴Se subrayada en cada subunidad la secuencia motif amino terminal de las hemocianinas de moluscos.

tos secundarios, está que direccionan la respuesta inmune hacia respuestas tipo Th1 a diferencia de otros adyuvantes, como por ejemplo la alumina que lo hace hacia respuestas tipo Th2²⁶.

Proteínas carrier para producir anticuerpos contra péptidos y haptenos

Las hemocianinas se han utilizado en la producción de un sinfín de anticuerpos contra pequeñas moléculas de interés diagnóstico, incluyendo hormonas, drogas, antibióticos, y toxinas, que son acopladas químicamente. Así, animales inmunizados producen anticuerpos contra la hemocianina y contra la sustancia transportada, los cuales posteriormente se purifican y aplican en diversos ensayos basados en las reacciones antígeno-anticuerpo²⁷.

Vacunas para patógenos

Péptidos inmunogénicos de patógenos acoplados a KLH han sido probados en el desarrollo de vacunas contra hongos, como *Cryptococcus neoformans*, causante de meningitis en enfermos con VIH²⁸, contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*²⁹ y contra virus como virus papiloma³⁰, influenza³¹ y VIH, en este último caso, enfocadas a desarrollar anticuerpos neutralizantes contra péptidos conservados entre distintas cepas³², o para prevenir la transmisión del virus a través del calostro materno³³. Cabe señalar que la inmunostimulación crónica generada por KLH acelera la progresión del VIH³⁴, descartándola como terapia, no así como vacuna preventiva.

Vacunas antitumorales

Las vacunas antitumorales han surgido como una alternativa a las terapias antiproliferativas de quimio o radioterapia, solas o combinadas con ellas, y se caracterizan por potenciar la inmunidad frente al tumor, es decir, están diseñadas con fines terapéuticos a diferencia de las vacunas profilácticas. Se centran en la búsqueda de epítomos específicos en las células tumorales, generando anticuerpos contra ellos y así activar, a su vez, el complemento o una respuesta citotóxica mediada por inmunoglobulinas (Ig), evitándose así la formación de micrometástasis. Estos epítomos se conocen como antígenos asociados a tumores³⁵, los cuales generalmente son ramificaciones aberrantes de polisacáridos localizados en la superficie celular,

tales como los glicolípidos Globo H y Lewis Y, GM2, GD2, GD3 y fucosyl-GM1; y las glicoproteínas MUC-1, Tn, sialyl Tn y TF³⁶. El objetivo de estas vacunas es transformar los antígenos tumorales en inmunógenos lo suficientemente potentes como para lograr desencadenar una respuesta inmune contra ellos. Aquí, las hemocianinas juegan un papel fundamental, utilizándose como proteínas *carrier* de dichos antígenos⁴. En el caso de los linfomas no Hodgkin, se usan las regiones variables de las inmunoglobulinas presentes en los clones oncogénicos de linfocitos B, vacunas conocidas como antiidiotípicas, que son dirigidas al paciente³⁷.

Las hemocianinas, además, se utilizan como agentes inmunomoduladores en las vacunas de células dendríticas, en las cuales, células presentadoras autólogas “se cargan” con el antígeno tumoral en presencia de KLH, ya sea con un lisado tumoral, antígeno recombinante o transfectando dichas células con ARN tumoral³⁸. En estos casos, la respuesta del paciente se mide mediante una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) contra KLH o el extracto tumoral³⁹. De manera análoga, se han obtenido resultados promisorios con CCH en pacientes con cáncer de próstata (Reyes D *et al.* Phase I/II Trial with dendritic cells loaded with an allogeneic prostate cancer-lysate in hormone-refractory prostate cancer patients: preliminary results. 9th Latin American Congress of Immunology, 2009).

A continuación se revisan algunos ensayos clínicos de vacunas que llevan hemocianina, aprobadas por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH, USA) (Tabla 2).

Melanomas, sarcomas y neuroblastomas. Las vacunas están conformadas por los gangliósidos GM2, GD2 y GD3 conjugados con KLH y llevan el adyuvante natural saponina, proveniente de *Quillaja saponaria* Molina, denominado QS21⁴⁰. Estas vacunas generan altos títulos de IgM e IgG en pacientes con melanoma, en comparación a vacunas que usan GM2 y como adyuvante BCG. Si bien en un comienzo se postuló que la inmunoterapia contra GM2 era efectiva en reducir el riesgo de recaídas en pacientes post operados con melanoma en etapa III (basado en un estudio con 52 pacientes, en que el 88% desarrolló anticuerpos IgM anti-GM2 y el 71% IgG)⁴¹ posteriormente,

Tabla 2. Algunas vacunas terapéuticas antitumorales evaluadas en ensayos clínicos que contienen el antígeno tumoral acoplado a hemocianina

Cáncer	Vacuna	Adyuvante	Fase clínica	Referencias
Melanoma	GM2-KLH	QS21	III (Suspendido)	42
	GD2L-KLH o GD3L-KLH	QSDG, OPT-821	II (En desarrollo)	43
Próstata	TFc-KLH	QS21	I (Concluido)	48
	MUC-2-KLH o Globo H-KLH	QS21, GPI-0100	II (Concluido)	49
	Hexavalente: Globo H-KLH, GM2-KLH, Lewis Y-KLH, MUC1-32 mer-KLH, TF(c)-KLH y Tn(c)-KLH	QS21	II (Concluido)	50
Mama	STn-KLH	QS21	II (Concluido)	52
	STn-KLH (Ciclofosfamida)	DETOX-B	III (En desarrollo)	53
Ovario	Heptavalente: GM2-KLH, Globo-H-KLH, Lewis Y-KLH, Tn(c)-KLH, STn(c)-KLH, TF(c)-KLH, y Tn-MUC1-KLH	OPT-821	III (En desarrollo)	54
Pulmón	Fucosil-GM1-KLH	QS21	I (Concluido)	55

un estudio clínico Fase III en 1.314 pacientes con melanoma en estado II, concluyó que dicha vacuna era ineficiente⁴². Citamos este caso porque estudios clínicos tempranos exitosos no siempre se corroboran en estudios clínicos posteriores que involucran un mayor número de pacientes.

Los gangliósidos GD2-Lactona y GD3-Lactona, se usan también como blancos terapéuticos, porque generan en los pacientes títulos de IgM e IgG mayores que para GM2. Basados en estos resultados, se encuentra en desarrollo un estudio Fase II de una vacuna bivalente que contiene ambos antígenos conjugados a KLH, ya sea con QS-DG una saponina sintética o un carbohidrato denominado OPT-821 como adyuvantes⁴³.

Respecto a las vacunas con células dendríticas, el primer estudio clínico reportado incluyó 16 pacientes con melanoma avanzado que fueron tratados con dendríticas cargadas con un lisado tumoral o una mezcla de péptidos de melanoma en presencia de KLH, factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF) e IL4 como inmunomoduladores. Los pacientes toleraron la vacuna y no desarrollaron autoinmunidad: 11 mostraron respuesta DTH positiva contra los péptidos y 5 mostraron regresión de las metástasis⁴⁴. Actualmente, otros antígenos como MART-1/MelanA, Tirosinasa, MAGE-3 y gp100 han sido cargados en células dendríticas CD34⁺ y evaluados en un ensayo clínico Fase I. Sus pro-

misorios resultados han justificado el diseño de estudios Fase II y III⁴⁵. En Chile, utilizando KLH y un lisado tumoral denominado TRIMEL, se han obtenido resultados prometedores ya que más de 60% de los pacientes DTH positivos muestran un aumento de la mediana de sobrevida de 33 meses, frente a 11 meses en los DTH negativos⁴⁶.

Cáncer de próstata: Numerosos antígenos tumorales acoplados a KLH han sido probados en vacunas monovalentes, bivalentes o polivalentes⁴⁷. Para el antígeno Thomsen-Friedenreich (TF), se realizó un ensayo clínico en 20 pacientes con cáncer prostático controlado quirúrgica o radiológicamente, que fueron vacunados 5 veces con distintas dosis. El título más alto de IgM se logró con la dosis más baja, de 1 mg de TF-KLH en la séptima semana⁴⁸. Con los antígenos MUC-2-KLH y Globo H-KLH se han obtenido resultados similares. En ambos casos, las vacunas contenían QS-21 o GPI-0100 como adyuvante y no hubo diferencias⁴⁹. Otro ensayo clínico Fase II con 30 pacientes, utilizó la vacuna hexavalente llevando los antígenos Globo H, GM2, Lewis Y, MUC1-32 mer, TF(c) y Tn(c), conjugados a KLH y llevando QS21; sus resultados plantearon la controversia de cuál estrategia es mejor, si vacunas mono o polivalentes, ya que si bien con las primeras se alcanzaron títulos más altos de anticuerpos, las polivalentes abarcan un mayor número de antígenos⁵⁰.

Cáncer de mama, ovario, trompas de Falopio y peritoneal: Sialyl-Tn es uno de los antígenos tumorales que se presenta más frecuentemente en los adenocarcinomas de mama, ovario, colon rectal, estómago y páncreas. Este antígeno, conjugado con KLH, se ha denominado *Theratope*⁵¹. El uso previo de ciclofosfamida antes de aplicar *Theratope* mejora tanto los títulos de anticuerpos anti-STn, como la supervivencia de los pacientes: 26,5 meses versus 9,2 meses de los pacientes control⁵². En otra aplicación, 27 pacientes con cáncer de mama de alto riesgo, fueron tratados con STn-KLH y QS21, lográndose en todos títulos de IgM e IgG significativos contra STn⁵³. Esta terapia está en evaluación desde 1999, en un ensayo clínico Fase III con 900 pacientes con cáncer de mama, desconociéndose sus resultados a la fecha.

También se han utilizado vacunas polivalentes formuladas con los antígenos GM2, Globo-H, Lewis Y, Tn(c), STn(c), TF(c), y Tn-MUC1, conjugados individualmente con KLH y adicionando QS21 o OPT-821⁴². Pruebas clínicas en 11 pacientes con cáncer de ovario, de trompa de Falopio o cáncer peritoneal, recibieron la vacuna heptavalente en 5 dosis cada 2 semanas, siendo bien tolerada, sin indicios de inducir autoinmunidad y con una respuesta de anticuerpos variable: los siete antígenos generaron IgM en al menos un paciente, en cambio IgG solo se obtuvo para Tn-MUC-1. Además, 8 pacientes mostraron títulos contra 3 de los antígenos presentes en la vacuna. Alternativamente, se han sintetizado estos antígenos y se han acoplado en una molécula de KLH, lográndose mejores títulos en relación a las vacunas con antígenos acoplados individualmente⁴⁷, resultados que han derivado en diversos ensayos clínicos en desarrollo.

Cáncer de pulmón: En la erradicación de las micrometástasis quimio-resistentes del cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC), se utiliza como blanco terapéutico el gangliósido fucosyl-GM1. En un estudio clínico de 11 pacientes con SCLC inyectados con este antígeno sintético acoplado a KLH, 8 de ellos mostraron títulos IgM (1:80) contra fucosyl-GM1 y sólo un paciente desarrolló IgG con un título similar, resultados que llevaron a un estudio Fase II⁵⁵.

Linfomas y mielomas: La estrategia de usar como antígenos tumorales la región variable de

la Ig en los linfomas no Hodgkin surgió en la década de 1970, pero sólo se lograron óptimas inmunizaciones con los idiotipos (ID) en la década siguiente, al ser conjugados con KLH⁵⁶. Su efecto se potenció al incorporar GM-CSF, porque facilita la inducción de células T CD8⁺, presumiblemente reclutando células dendríticas en la zona de vacunación⁵⁷. El primer estudio clínico Fase I se realizó en pacientes con linfoma folicular tratados con quimioterapia, que fueron inmunizados con la inmunoglobulina autóloga del tumor conjugada con KLH: 41% generó anticuerpos anti-ID y 17% mostró respuesta proliferativa celular⁵⁸. Luego, en estudios clínicos Fase II, utilizando GM-CSF en pacientes tratados con un régimen de quimioterapia uniforme, mostraron 75% de respuesta de anticuerpos y 95% de activación de células CD4⁺ y CD8⁺⁵⁹. Estos alentadores resultados permitieron iniciar ensayos clínicos Fase III para establecer, definitivamente, los beneficios clínicos inducidos por las vacunas antiidiotípicas³⁷.

Vacunas contra drogas de abuso

Se encuentran en desarrollo vacunas para frenar la reincidencia de los adictos a drogas de abuso. Consisten en generar anticuerpos que disminuyan la concentración libre sanguínea de la droga y su efecto a nivel del sistema nervioso central, al impedir que traspasen la barrera hematoencefálica. Los estudios preclínicos usando KLH como *carrier* de estas drogas son auspiciosos⁶⁰, no obstante, la única evidencia clínica con este propósito utilizó como *carrier* de cocaína la subunidad-B de la toxina colérica, con buenos resultados⁶¹.

Inmunoestimulante no específico en la terapia del carcinoma superficial de vejiga

Los inmunoestimulantes no específicos pueden modular la respuesta inmune actuando como eficaces agentes antitumorales. Es el caso de la terapia del CSV mediante instilación de BCG por la uretra, luego de eliminar quirúrgicamente el tumor, un tratamiento eficiente pero con efectos secundarios adversos⁶². Olsson et al⁶³, evaluando el estado inmunológico de pacientes con CSV, encontraron una disminución significativa en la recurrencia del tumor en los sujetos que recibieron subcutáneamente KLH, abriendo la puerta para usarla, por sí sola, como inmunoestimulante no específico para tratar dicho cáncer. Jurincic et al⁶⁴, compararon KLH con mitomicina C en 44 pacien-

tes y encontraron que KLH fue más eficiente en prevenir la recurrencia del tumor. Posteriormente, Flamm et al⁶⁵ comunicaron que la terapia con KLH no mostraba diferencias frente a la terapia con etoglúcidos. Por otro lado, Wishahi et al⁶⁶ confirmaron la efectividad de KLH en pacientes diagnosticados con CSV asociado a esquistosomiasis. Este conjunto de resultados sustentaron que la inmunoterapia con KLH es eficaz para esta patología y sin efectos secundarios adversos³. Recientemente se demostró por primera vez que una hemocianina diferente como es CCH, tiene similares efectos que KLH: ratones previamente sensibilizados con CCH y desafiados con células tumorales de vejiga muestran una poderosa respuesta de tipo Th1, esto es, se activan las células asesinas naturales (*Natural Killer*) con un concomitante aumento del IFN γ circulante¹¹.

Otros usos biomédicos

Las hemocianinas se han utilizado como trazadores inmunológicos en test de inmunocompetencia⁶⁷, desarrollándose protocolos especiales para diferentes situaciones clínicas tales como depresión psicológica⁶⁸, DTH en pacientes quirúrgicos⁶⁹, en respuestas post trauma cardíaco en adultos mayores⁷⁰ o para evaluar respuesta en pacientes con inmunodeficiencia común variable⁷¹.

En diagnóstico, debido a la similitud entre oligosacáridos del *Schistosoma mansoni* y los presentes en KLH, los anticuerpos del suero de pacientes infectados muestran reacción cruzada con KLH, lo cual se utiliza para diagnosticarlos mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) que usa KLH y que discrimina entre infecciones agudas o crónicas⁷².

Conclusiones y perspectivas futuras

Conociendo el mecanismo de inmunostimulación de las hemocianinas, podríamos dirigirlo hacia inmunoterapias más efectivas. Si consideramos la biodiversidad de moluscos que habitan nuestras costas y su potencial en cuanto al poder inmunogénico que sus hemocianinas contienen, auguramos que el desarrollo de la inmunofarmacología en base a estas proteínas es inconmensurable. Al respecto, por ejemplo,

hemos descubierto que la hemocianina de la lapa negra (*Fissurella latimarginata* FLH) es significativamente más inmunogénica que KLH y CCH⁷³, observación que nos tiene investigando cuáles son las características estructurales que le confieren esta propiedad y evaluando el potencial uso de esta nueva hemocianina en vacunas antitumorales.

Agradecimientos: Al Profesor Alfredo E. De Ioannes (Pontificia Universidad Católica de Chile y Biosonda S.A.) por el descubrimiento y contribución al conocimiento de la hemocianina de *C. concholepas*. A los Médicos Rodrigo Andrés Leal Becker y Manuel Nájera De Ferrari por la revisión crítica del manuscrito. A Gabriel De Ioannes por el diseño del esquema sobre la estructura de las hemocianinas de moluscos.

Referencias

1. van Holde KE, Miller KI. Hemocyanins. *Adv Protein Chem* 1995; 47: 1-81.
2. Harris JR, Markl J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 1999; 30: 597-623.
3. Markl, J, Lieb B, Gebauer W, Altenhein B, Meissner U, Harris JR. Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127 (suppl 2): R3-9.
4. Musselli C, Livingston PO, Ragupathi G. Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127 (suppl 2): R20-6.
5. Lamm DL, Dehaven JJ, Riggs DR. Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of bladder cancer: laboratory and clinical studies. *Eur Urol* 2000; 37 (suppl 3): 41-4.
6. Millard AL, Ittelet D, Schooneman F, Bernard J. Dendritic cell KLH loading requirements for efficient CD4+ T-cell priming and help to peptide-specific cytotoxic T-cell response, in view of potential use in cancer vaccines. *Vaccine* 2003; 21: 869-76.
7. Oliva H, Moltedo B, De Ioannes P, Faunes F, De Ioannes AE, Becker MI. Monoclonal antibodies to molluscan hemocyanin from *Concholepas concholepas* demonstrate common and specific epitopes among subunits. *Hybrid Hybridomics* 2002; 21: 365-74.
8. De Ioannes P, Moltedo B, Oliva H, Pacheco R, Faunes F, De Ioannes AE, et al. Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J Biol Chem* 2004; 279: 26134-42.

9. Matus S, Burgos PV, Bravo-Zehnder M, Kraft R, Porras OH, Fariás P, et al. Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *J Exper Med* 2007; 204: 3221-34.
10. Pilon J, Loiacono C, Okeson D, Lund S, Vercauteren K, Rhyan J, et al. Anti-prion activity generated by a novel vaccine formulation. *Neurosci Lett* 2007; 429: 161-4.
11. Moltedo B, Faunes F, Haussmann D, De Ioannes P, De Ioannes AE, Puente J et al. Immunotherapeutic effect of *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J Urol* 2006; 176: 2690-5.
12. Swerdlow RD, Ebert RE, Lee P, Bonaventura C, Miller KI. Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996; 113: 537-48.
13. Idakieva K, Nikolov P, Chakarska I, Genov N, Shnyrov VL. Spectroscopic properties and conformational stability of *Concholepas concholepas* hemocyanin. *J Fluoresc* 2008;18: 715-25.
14. Manubens A, Salazar F, Haussman D, Figueroa J, Del Campo M, Martínez J, et al. *Concholepas* hemocyanin biosynthesis takes place in the hepatopancreas, with hemocytes being involved in its metabolism. *Cell Tissue Res* DOI 10.1007/s00441-010-1057-6.
15. Dolaska-Angelova P, Lieb B, Velkova L, Heilen N, Sandra K, Nikolaeva-Glomb L, et al. Identification of glycosylated sites in *Rapana* hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. *Biocong Chem* 2009; 20: 1315-22.
16. Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garbier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachere E Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem* 2001; 276: 47070-7.
17. Arancibia SA, Beltran CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F. et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007; 40: 97-112.
18. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:713-58.
19. Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis E, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000; 191: 927-36.
20. Presicce P, Taddeo A, Conti A, Villa ML, Della Bella S. Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Mol Immunol* 2008; 45: 1136-45.
21. Moltedo B, López CB, Pazos M, Becker MI, Hermesh T, Moran TM. Cutting edge: stealth influenza virus replication precedes the initiation of adaptive immunity. *J Immunol* 2009; 183: 3569-73.
22. Teitz-Tennenbaum S, Li Q, Davis MA, Chang AE. Dendritic cells pulsed with keyhole limpet hemocyanin and cryopreserved maintain anti-tumor activity in a murine melanoma model. *Clin Immunol* 2008; 129: 482-91.
23. Becker MI, Fuentes A, Del Campo M, Manubens A, Nova E, Oliva H, et al. Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas* hemocyanin is associated with unique biochemical properties. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 330-9.
24. Tchorbanov A, Idakieva K, Mihaylova N, Doumanova L. Modulation of the immune response using *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 1033-8.
25. Benítez-Ribas D, Adema GJ, Winkels G, Klasen IS, Punt CJ, Figdor CG, et al. Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake. *J Exp Med* 2006; 203: 1629-35.
26. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 505-17.
27. Shen S, Zhang F, Zeng S, Tian Y, Chai X, Gee S et al. Development of enantioselective polyclonal antibodies to detect styrene oxide protein adducts. *Anal Chem* 2009; 81: 2668-77.
28. May RJ, Beenhouwer DO, Scharff MD. Antibodies to keyhole limpet hemocyanin cross-react with an epitope on the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* and other carbohydrates: implications for vaccine development. *J Immunol* 2003; 171: 4905-12.
29. Hughes EE, Gilleland HE Jr. Ability of synthetic peptides representing epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* to afford protection against *P. aeruginosa* infection in a murine acute pneumonia model. *Vaccine* 1995; 13: 1750-3.
30. Slupetzky K, Gambhira R, Culp TD, Shafti-Keramat S, Schellenbacher C, Christensen ND, et al. A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. *Vaccine* 2007; 25: 2001-10.
31. Fan J, Liang X, Horton MS, Perry HC, Citron MP, Heidecker GJ, et al. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* 2004; 22: 2993-3003.
32. Fiorentini S, Marsico S, Becker PD, Iaria ML, Bruno R,

- Guzman CA, et al. Synthetic peptide AT20 coupled to KLH elicits antibodies against a conserved conformational epitope from a major functional area of the HIV-1 matrix protein p17. *Vaccine* 2008; 26: 4758-65.
33. Dorosko SM, Ayres SL, Connor RI. Induction of HIV-1 MPR(649-684)-specific IgA and IgG antibodies in caprine colostrum using a peptide-based vaccine. *Vaccine* 2008; 26: 5416-22.
 34. Villinger F, Rowe T, Parekh BS, Green TA, Mayne AE, Grimm B, et al. Chronic immune stimulation accelerates SIV-induced disease progression. *J Med Primatol* 2001; 30: 254-9.
 35. Checkhun VF. Cancer vaccines. *Exp Oncol* 2008; 30: 90.
 36. Galonic DP, Gin DY. Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumor vaccines. *Nature* 2007; 446: 1000-7.
 37. Neelapu SS, Kwak LW. Vaccine therapy for B-cell lymphomas: next-generation strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 243-9.
 38. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449: 419-26.
 39. Escobar A, López M, Serrano A, Ramírez M, Pérez C, Aguirre A, et al. Dendritic cell immunization alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 555-68.
 40. Livingston PO. Approaches to augmenting the immunogenicity of melanoma gangliosides: from whole melanoma cells to ganglioside-KLH conjugate vaccines. *Immunol Rev* 1995; 145: 147-66.
 41. Chapman PB, Morrissey DM, Panageas KS, Hamilton WB, Zhan C, Destro AN, et al. Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS21 vaccine: a dose-response study. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 874-9.
 42. Eggermont AM, Suciú S, Ruka W, Marsden J, Testori A, Corrie P, et al. EORTC 18961: Post-operative adjuvant ganglioside GM2-KLH21 vaccination treatment vs observation in stage II (T3-T4N0M0) melanoma: 2nd interim analysis led to an early disclosure of the results. *J Clin Oncol* 2008; 26 (suppl 15): 9004.
 43. Ragupathi G, Livingston PO, Hood C, Gathuru J, Krown SE, Chapman PB, et al. Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5214-20.
 44. Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-32.
 45. Fay JW, Palucka AK, Paczesny S, Dhodapkar M, Johnston DA, Burkeholder S, et al. Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with melanoma peptide-pulsed CD34(+) progenitor-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1209-18.
 46. López MN, Pereda C, Segal G, Muñoz L, Aguilera R, González FE, et al. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *J Clin Oncol* 2009; 27: 945-52.
 47. Zhu J, Wan Q, Lee D, Yang G, Spassova MK, Ouerfelli O, et al. From synthesis to biologics: preclinical data on a chemistry derived anticancer vaccine. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 9298-303.
 48. Slovin SF, Ragupathi G, Musselli C, Fernández C, Diani M, Verbel D, et al. Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 694-702.
 49. Slovin SF, Ragupathi G, Fernandez C, Jefferson MP, Diani M, Wilton AS, et al. A bivalent conjugate vaccine in the treatment of biochemically relapsed prostate cancer: a study of glycosylated MUC-2-KLH and Globo H-KLH conjugate vaccines given with the new semi-synthetic saponin immunological adjuvant GPI-0100 OR QS-21. *Vaccine* 2005; 23: 3114-22.
 50. Slovin SF, Ragupathi G, Fernandez C, Diani M, Jefferson MP, Wilton A, et al. A polyvalent vaccine for high-risk prostate patients: "are more antigens better?" *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1921-30.
 51. Holmberg LA, Sandmaier BM. Vaccination with Theratope (STn-KLH) as treatment for breast cancer. *Expert Rev Vaccines* 2004; 3: 655-63.
 52. Miles D, Papazisis K. Rationale for the clinical development of STn-KLH (Theratope) and anti-MUC-1 vaccines in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003; 3 suppl 4: S134-8.
 53. Gilewski TA, Ragupathi G, Dickler M, Powell S, Bhuta S, Panageas K, et al. Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2977-85.
 54. Sabbatini PJ, Ragupathi G, Hood C, Aghajanian CA, Juretzka M, Iasonos A, et al. Pilot study of a heptavalent vaccine-keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS21 in patients with epithelial ovarian, fallopian tube,

- or peritoneal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4170-7.
55. Krug LM, Ragupathi G, Hood C, Kris MG, Miller VA, Allen JR, et al. Vaccination of patients with small-cell lung cancer with synthetic fucosyl GM-1 conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6094-100.
 56. Kaminski MS, Kitamura K, Maloney DG, Levy R. Idiotypic vaccination against murine B cell lymphoma. Inhibition of tumor immunity by free idiotype protein. *J Immunol* 1987; 138: 1289-96.
 57. Kwak LW, Young HA, Pennington RW, Weeks SD. Vaccination with syngeneic, lymphoma-derived immunoglobulin idiotype combined with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes mice for a protective T-cell response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10972-7.
 58. Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D, Kwak LW, Liles TM, Syrengelas A, et al. Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma--long-term results of a clinical trial. *Blood* 1997; 89: 3129-35.
 59. Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, Benko FA, Sterns LA, Pennington R, et al. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med* 1999; 5: 1171-7.
 60. Moreno AY, Janda KD. Immunopharmacotherapy: vaccination strategies as a treatment for drug abuse and dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 92: 199-205.
 61. Martell BA, Orson FM, Poling J, Mitchell E, Rossen RD, Gardner T, et al. Cocaine vaccine for the treatment of cocaine dependence in methadone-maintained patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial. *Arch Gen Psychiatry* 2009; 66: 1116-23.
 62. Lamm DL, Stogdill VD, Stoddill BJ, Crispen RG. Complications of Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in 1,278 patients with bladder cancer. *J Urol* 1986; 135: 271-4.
 63. Olsson CA, Chute R, Rao CN. Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *J Urol* 1974; 111: 173-6.
 64. Jurincic CD, Engelmann U, Gasch J, Klippel KF. Immunotherapy in bladder cancer with keyhole-limpet hemocyanin: a randomized study. *J Urol* 1988; 139: 723-6.
 65. Flamm J, Bucher A, Hörtl W, Albrecht W. Recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: adjuvant topical chemotherapy versus immunotherapy. A prospective randomized trial. *J Urol* 1990; 144: 260-3.
 66. Wishahi MM, Ismail IM, Ruebben H, Otto T. Keyhole-limpet hemocyanin immunotherapy in the bilharzial bladder: a new treatment modality? Phase II trial: superficial bladder cancer. *J Urol* 1995; 153: 926-8.
 67. Swanson MA, Schwartz RS. Immunosuppressive therapy. The relation between clinical response and immunologic competence. *N Engl J Med* 1967; 277: 163-70.
 68. Snyder BK, Roghmann KJ, Sigal LH. Stress and psychosocial factors: effects on primary cellular immune response. *J Behav Med* 1993; 16: 143-61.
 69. Puyana JC, Rode HN, Christou NV, Meakins JL, Gordon J. Induction of an immune response to keyhole-limpet hemocyanin in surgical patients with anergy. *Surgery* 1990; 107: 442-8.
 70. Grant RW, Mariani RA, Vieira VJ, Fleshner M, Smith TP, Keylock KT, et al. Cardiovascular exercise intervention improves the primary antibody response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) in previously sedentary older adults. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 923-32.
 71. Kondratenko I, Amlot PL, Webster AD, Farrant J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. MRC Immunodeficiency Group. *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 9-13.
 72. Beck L, Van-Lume DS, Souza JR, Domingues AL, Favre T, Abath FG, Montenegro SM. Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. *Acta Trop* 2008; 108: 229-33.
 73. Espinoza C, De Ioannes AE, Becker MI. Caracterización bioquímica e inmunológica de la hemocianina de tres especies de lapas chilenas de la Familia *Fissurellidae*. *Biol Res* 2006; 39 (suppl B): R87.