

Nanomedicina: Terapia Génica

M^a Angeles Muñoz-Fernández
Jefe Sección Inmunología
Hospital General Universitario
Gregorio Marañón



Introducción: nanomedicina

NANOPARTÍCULAS finalidad
 (1-100nm)

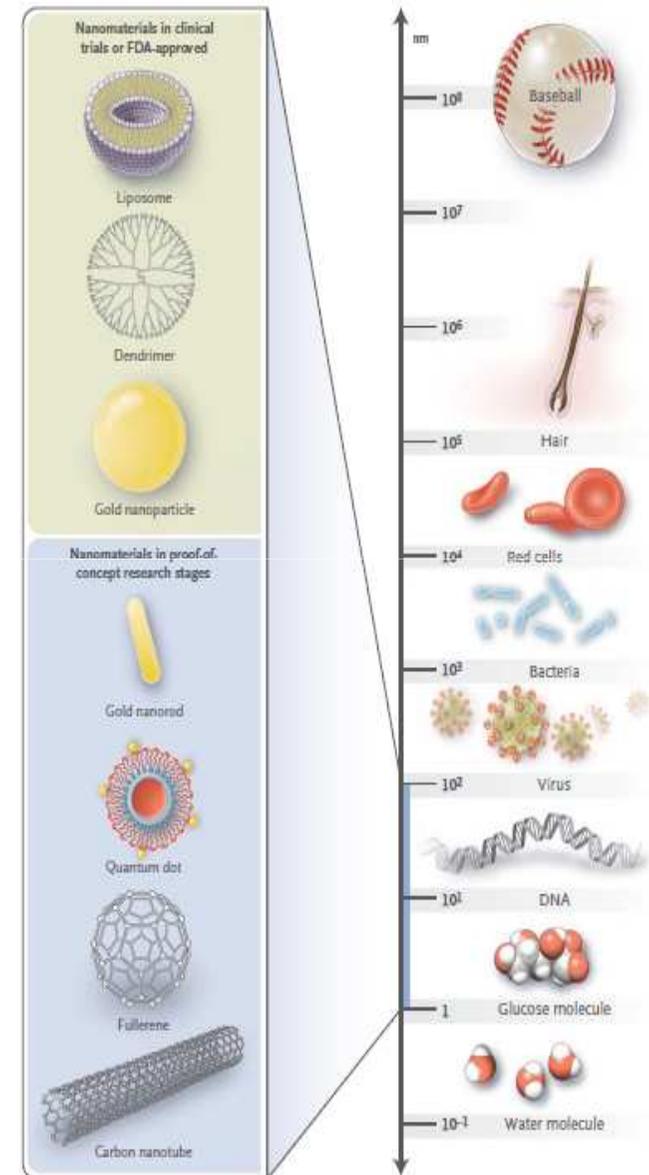
- preventiva,
- terapéutica,
- diagnóstico.

Mejora del tratamiento actual:

Nuevas estrategias
 terapéuticas, terapia
 génica e inmunoterapia.

Nanomateriales con efecto terapéutico por si solos.

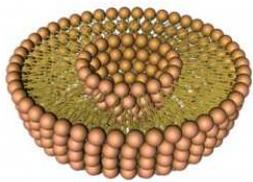
Expert Opin Drug Deliv 6, 771-784 (2009)
Nanobiotechnology 9, 30 (2011)
Dalton Trans (2012)



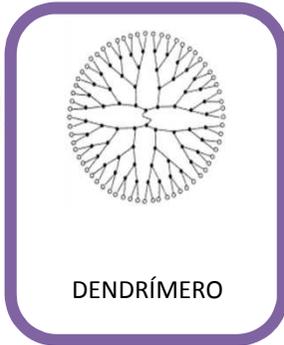
Betty et al. *N Engl J Med* 2010;363:2434-43.

Introducción: nanomedicina

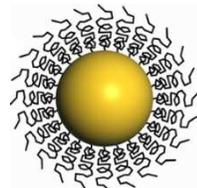
NANOMATERIALES EN ENSAYOS CLÍNICOS O APROBADOS POR LA FDA



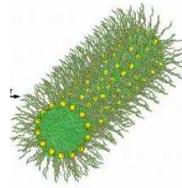
LIPOSOMA



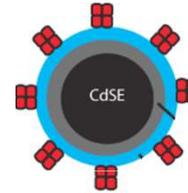
DENDRÍMERO



NANOPARTÍCULA DE ORO



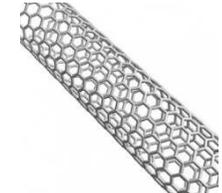
NANOVARA DE ORO



PUNTO CUÁNTICO (QUANTUM DOTS)



FULLERENO



NANOTUBO DE CARBONO

Introducción

DENDRIMEROS: Moléculas que derivan de la síntesis de polímeros:

DENDRIMERO
 =
dendron (árbol o rama)
 +
mero (segmento)

Nanoscópicas

Poliramificadas

Facilidad de
incorporar ligandos

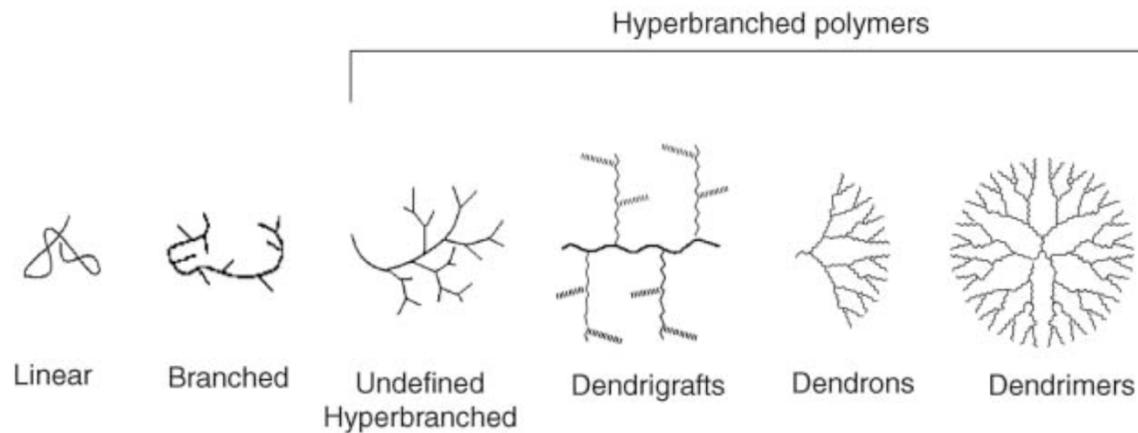
Alta funcionalidad
(grupos terminales)

Síntesis controlada



monodispersas

HOMOGENEIDAD
 (tamaño, forma,
 química de
 superficie e interior,
 flexibilidad y
 topología)



Molecular well-defined (monodisperse) dendritic polymers

Introducción

ESTRUCTURA DE LOS DENDRIMEROS:

1. **NÚCLEO CENTRAL** origen de las ramificaciones, microambiente protegido por las estructuras más externas.
2. **RAMIFICACIONES:** salen del núcleo central. El número y tamaño varían en función de la generación del dendrímero.
3. **GRUPOS FUNCIONALES:** grupos periféricos. Generalmente definen la funcionalidad del dendrímero.

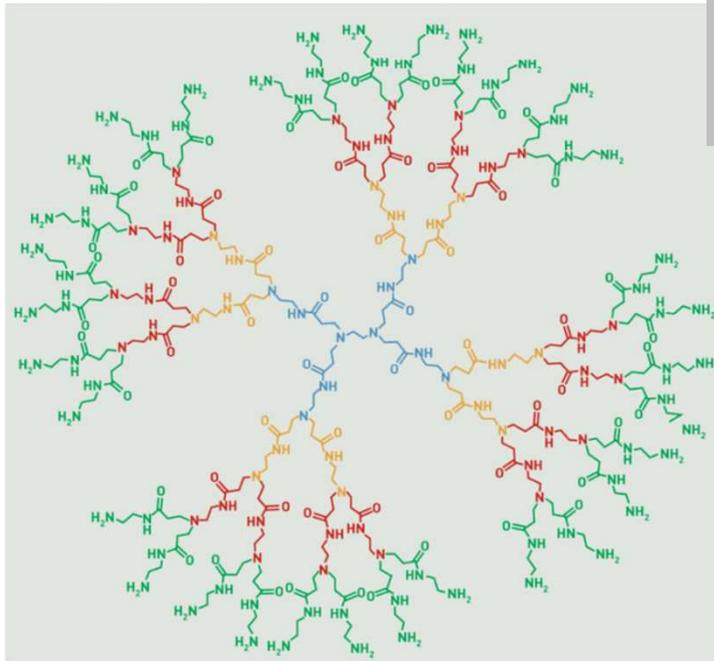
Núcleo

1ª generación

2ª generación

3ª generación

4ª generación



GENERACIONES:

El número de generación del dendrímero depende del número de ramas o de puntos focales que encontramos en las ramas.

Fourth generation polyamidoamine (PAMAM) dendrimer.

Castriciano, et al. (2008)

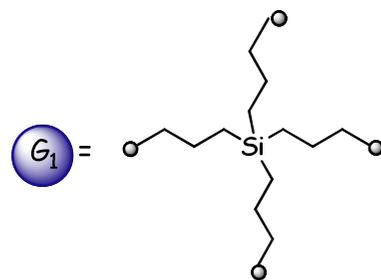
Introducción

TOXICIDAD ASOCIADA A GENERACIÓN:

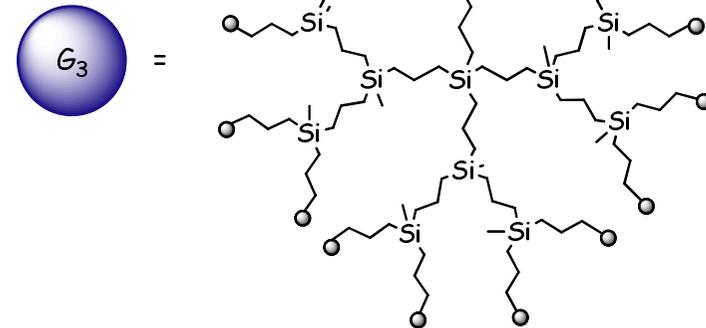
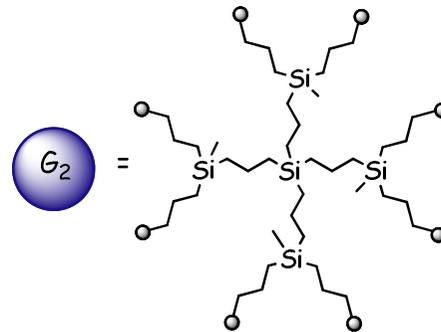
A mayor generación:

✓ más grupos funcionales

✗ toxicidad mayor



○ = SiMe_2 o SiMe

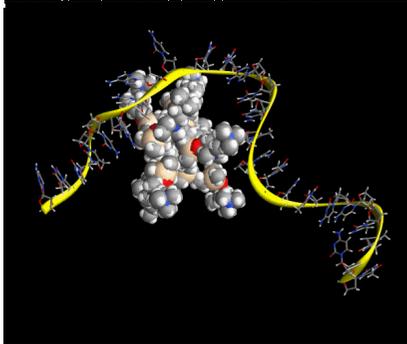


✓ Hidrosolubles con núcleo lipofílico (\neq PAMAM hidrofílicos)

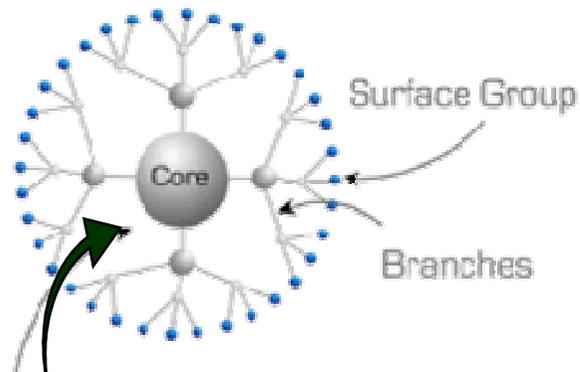
✓ Uso de generaciones bajas (toxicidad $<20\%$)

Introducción

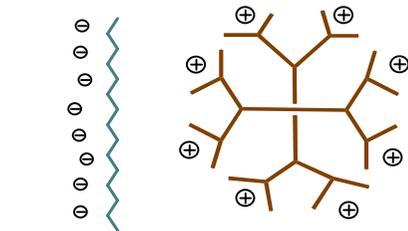
APLICACIONES:



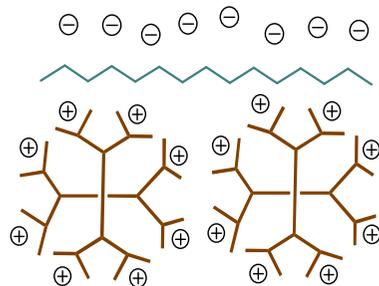
Dendrimers: Precise Nanostructures



Grupos catiónicos
Terapia Génica



Formación
Dendriplex

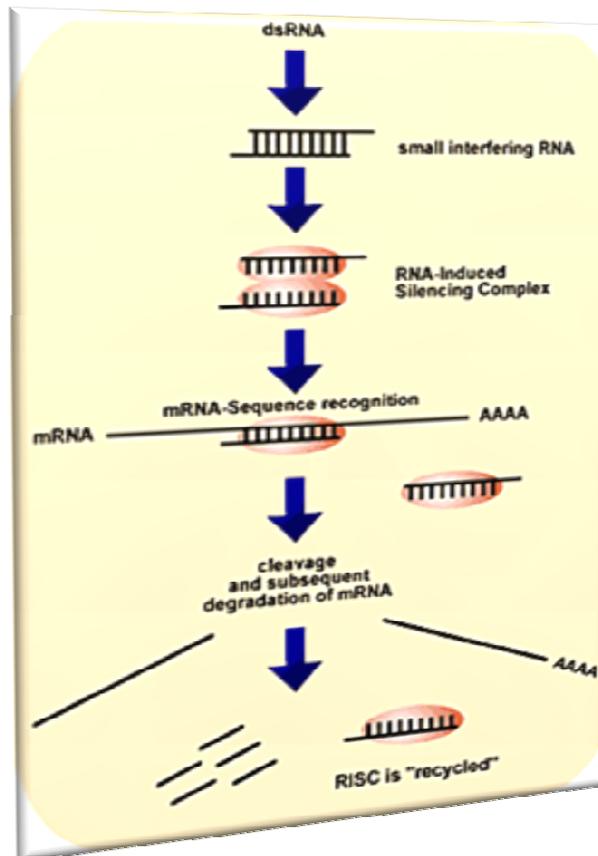


Bolsillos centrales cerca del núcleo dan un microambiente para contener y proteger moléculas pequeñas.

Grupos periféricos cargados se unen fuertemente a moléculas de carga opuesta tales como siRNA, mediante interacciones electrostáticas.

Introducción

RNA de interferencia (siRNA)

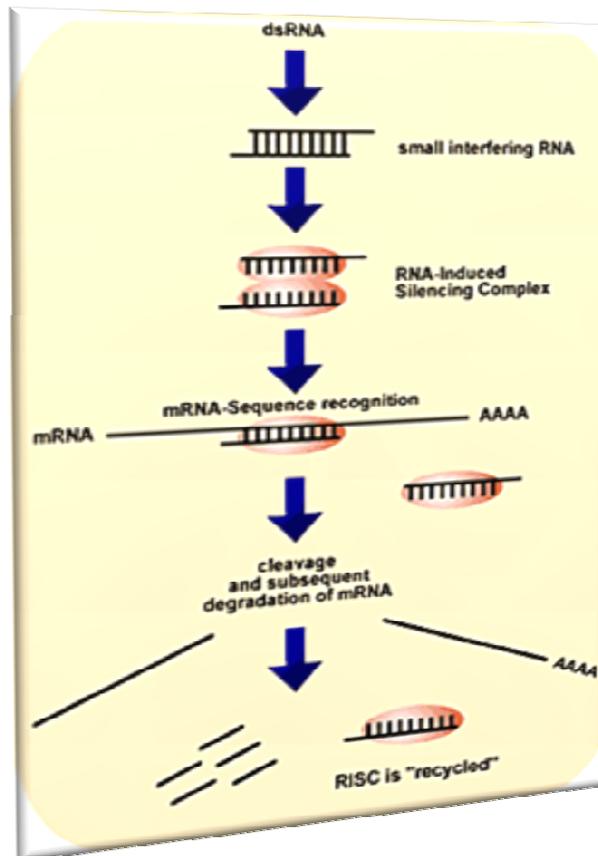


Fuente: **Andrew Fire and Craig Mello**
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006
"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

- Los siRNA son RNAs pequeños de cadena doble (20-21 nucleótidos) complementarias. que se originan a partir de una RNA largo de doble cadena (dsRNA). los dsRNA pueden ser de origen endógeno (por ejemplo los transcritos generados a partir de secuencias de DNA repetidas en tandem) o exógenos (como virus o transgenes).
- Los siRNAs suprimen la expresión de los genes dianas mediante el corte del mRNA complementario en dos mitades, a través de la interacción de la hebra antisentido del siRNA con el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Las dos mitades del mRNA son posteriormente degradadas por la maquinaria celular, lo que conlleva la supresión de la expresión del gen.

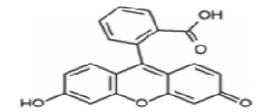
Introducción

RNA de interferencia (siRNA)



Fuente: Andrew Fire and Craig Mello
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006
 "for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

- Los siRNA son RNAs pequeños de cadena doble (20-21 nucleótidos) los cuales son capaces de inhibir la traducción de una determinada proteína endógena o exógena (patógeno) al inducir la degradación de su RNA homólogo.
- Han demostrado la inhibición eficiente de la expresión de un gen de manera secuencia específica.
- Se considera una buena alternativa la utilización de los siRNA en el tratamiento frente al VIH



NAME	ANTISENSE SEQUENCE 5'-3'	NUCLEOTIDES
siGag	UGUCACUCCCCUUGGUUCUCdTdT	23
siNef	UGUGCUUCUAGCCAGGCACdTdT	21
sip24	CCUGUCUCUCAGUACAAUCUU	21

Introducción



Introducción

Liberación de siRNA *in vitro*

Lípidos catiónicos



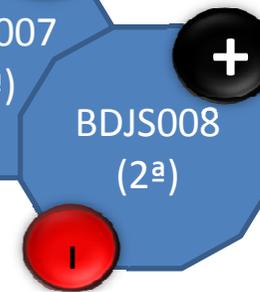
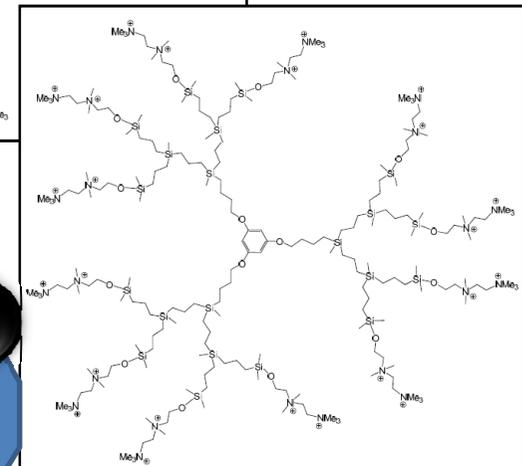
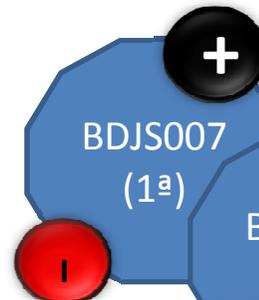
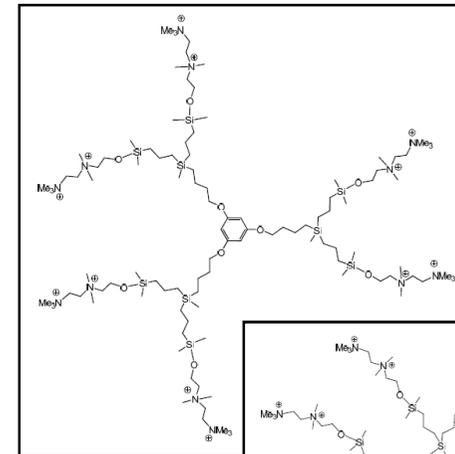
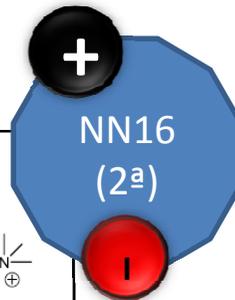
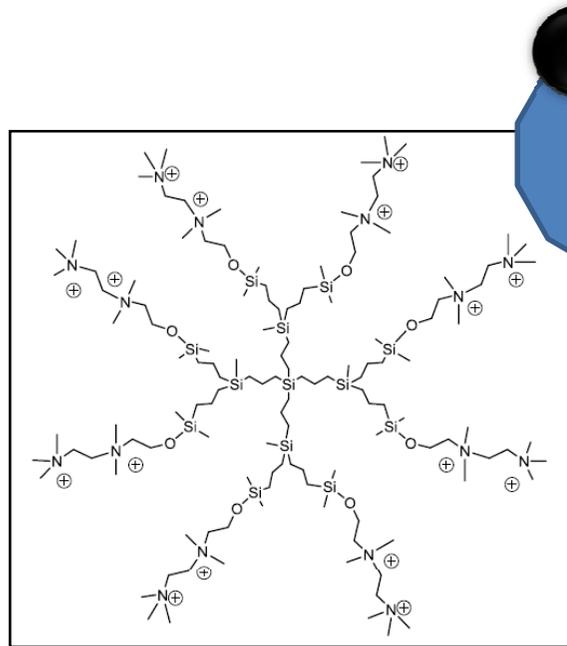
Vectores virales (Adenovirus)



Tienen problemas de citotoxicidad e inmunogenicidad cuando se utilizan en diferentes líneas celulares en *in vivo*.

Resultados

BDBR20
BDEA41
BDEA53
Stp2343
Stp2711
Stp2712
BDEF023
NN16
BDJS007
BDJS008
BDJS009
BDEF033
BDEF034



Resultados obtenidos
 con un CBS de segunda
generación que tiene
16 cargas positivas

Dendrímero Carbosilano
Soluble en agua

Resultados

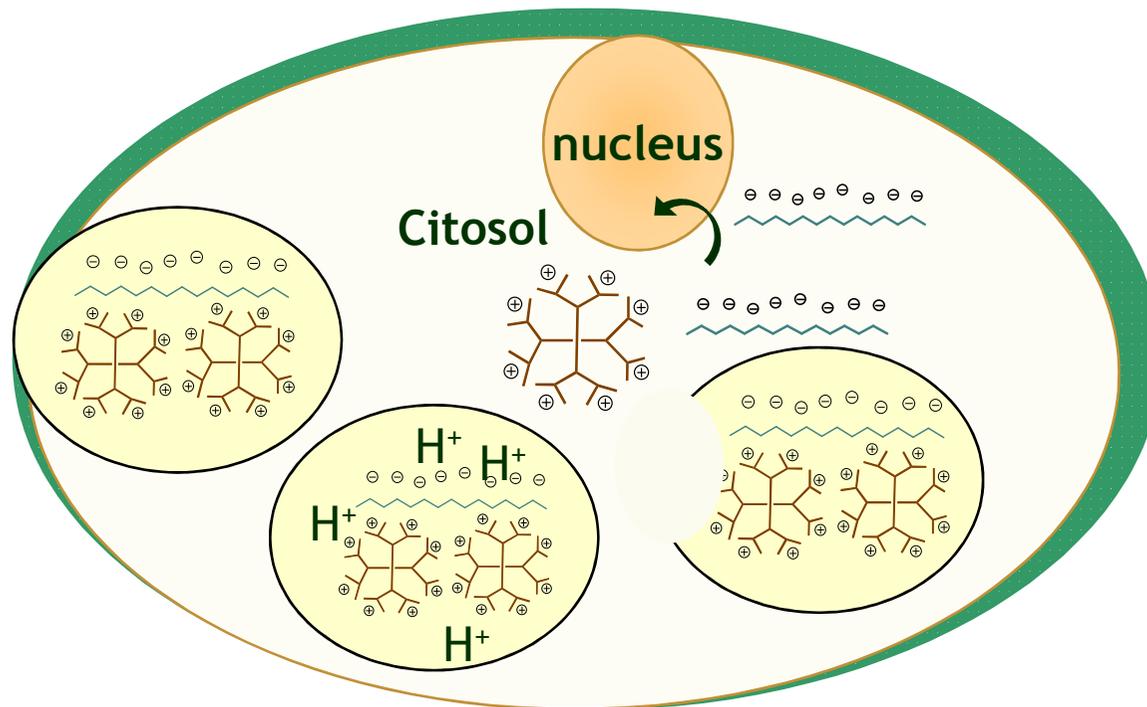
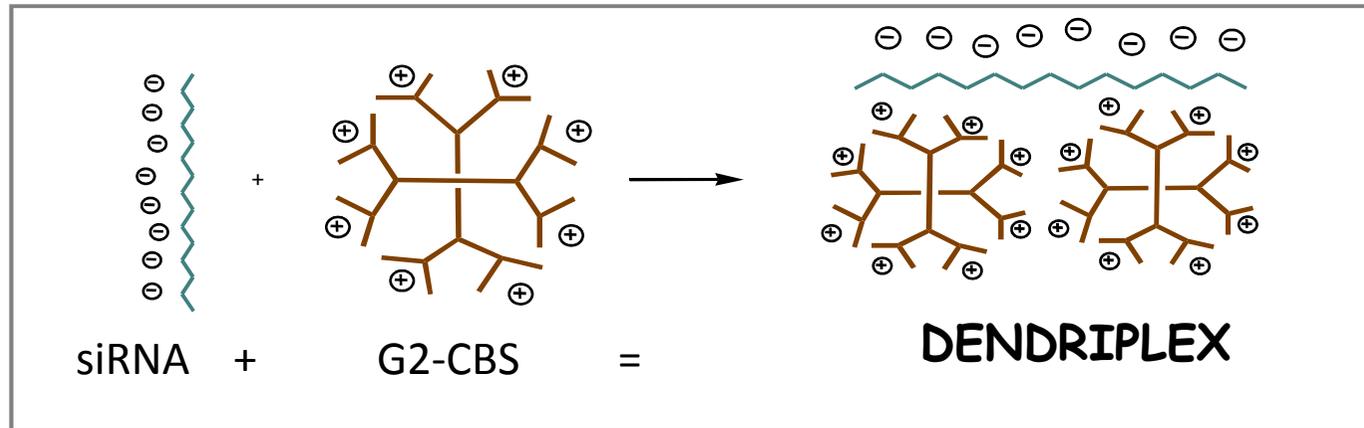
Bicompatibilidad dendrímeros

Condiciones a cumplir para un dendrímero con posible aplicación biológica:

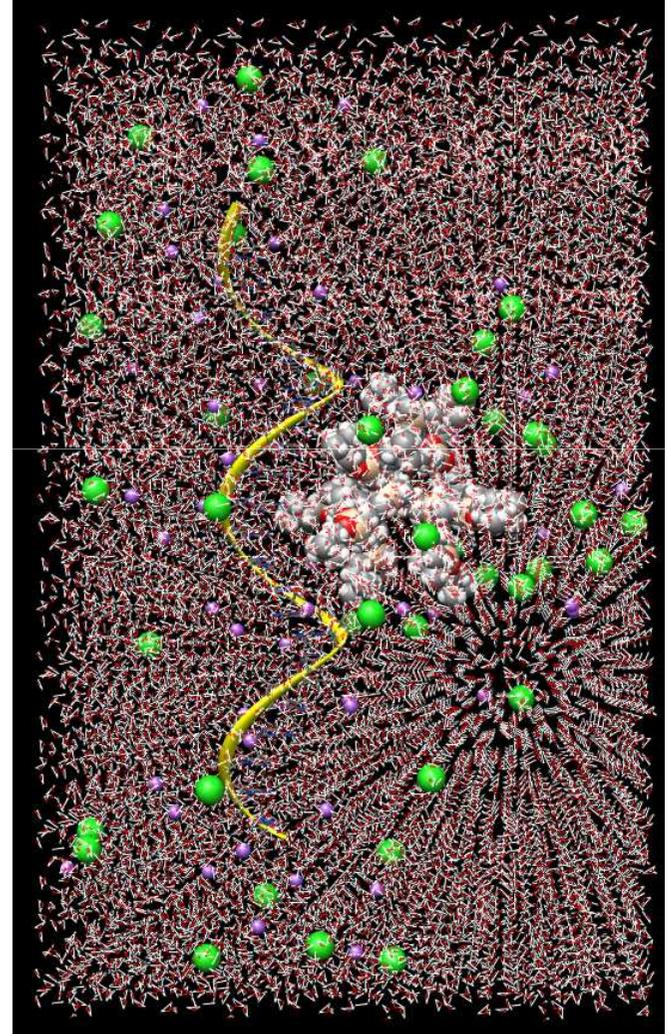
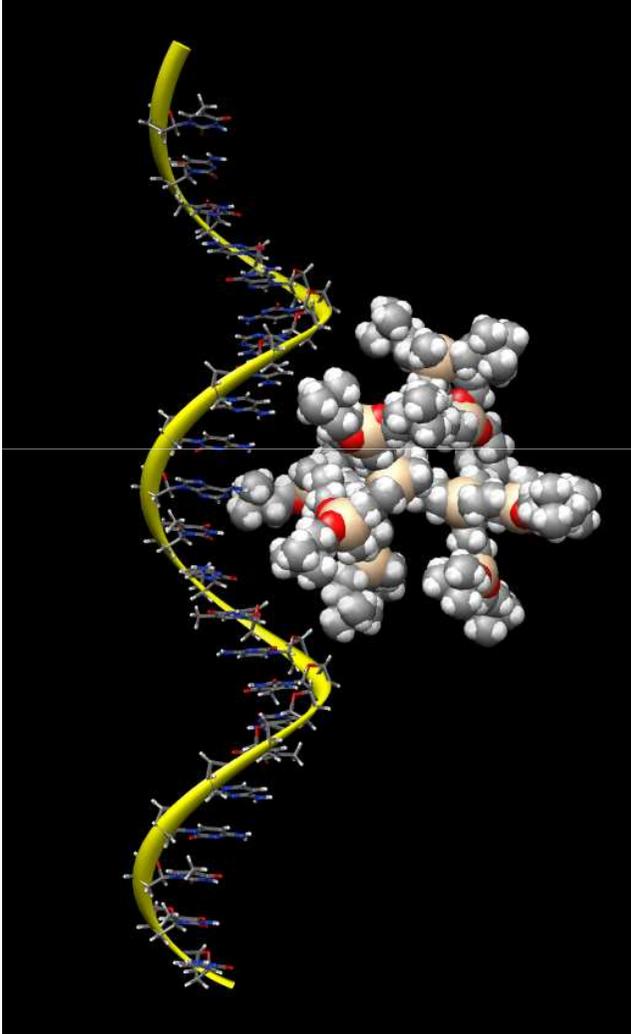
- ✓ Ser no tóxicos y no inmunogénicos.
- ✓ Ser capaces de atravesar barreras biológicas tales como membranas celulares, pared intestinal, etc.
- ✓ Deben permanecer en el torrente sanguíneo el tiempo necesario para tener el efecto clínico deseado.
- ✓ Deben poder ser dirigidos a estructuras celulares específicas.

Resultados

Dendriplex: interacción electrostática

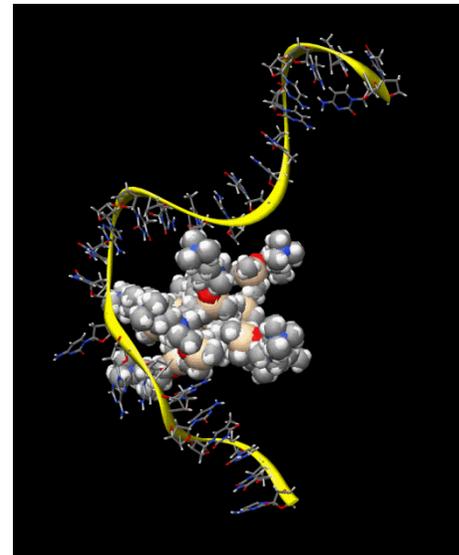
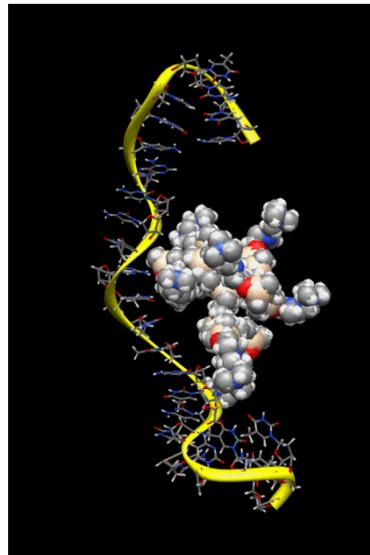
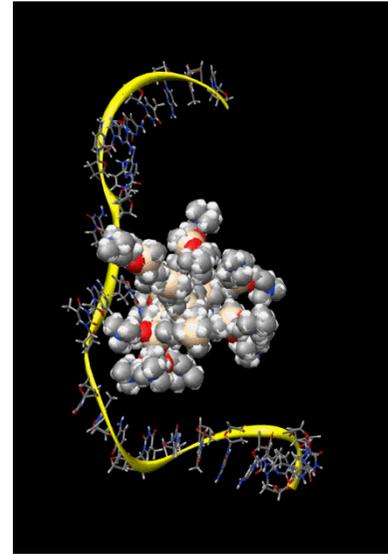
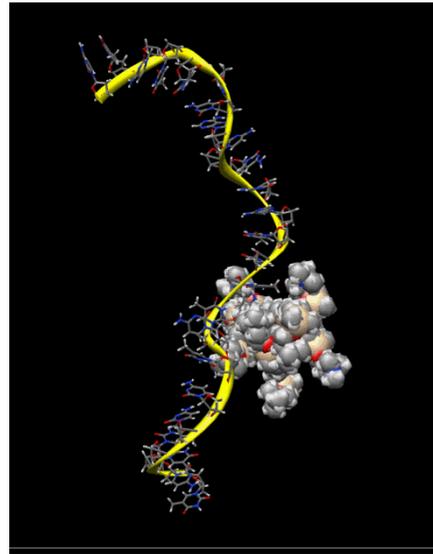


Initial system



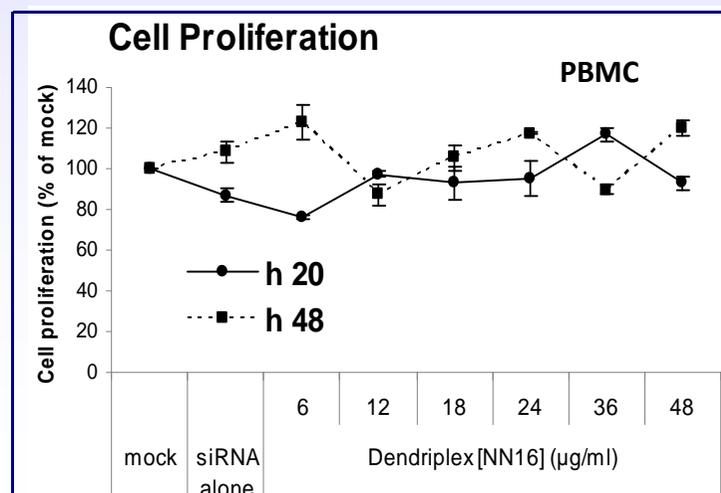
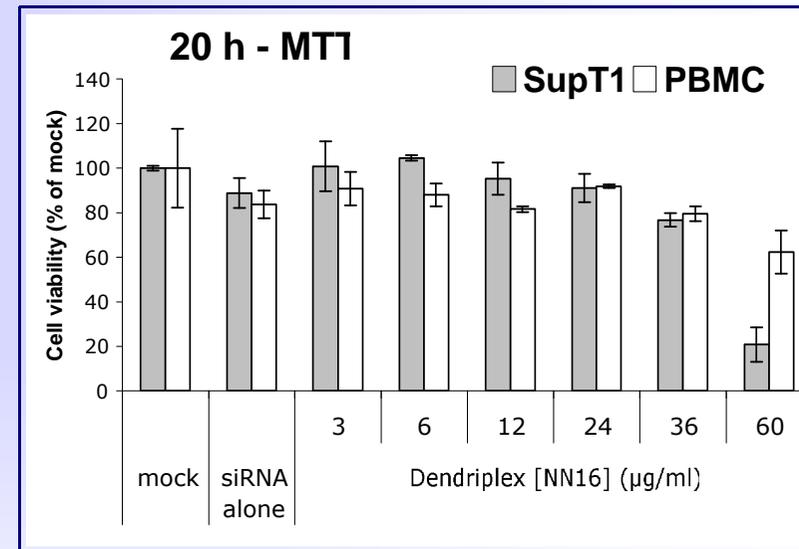
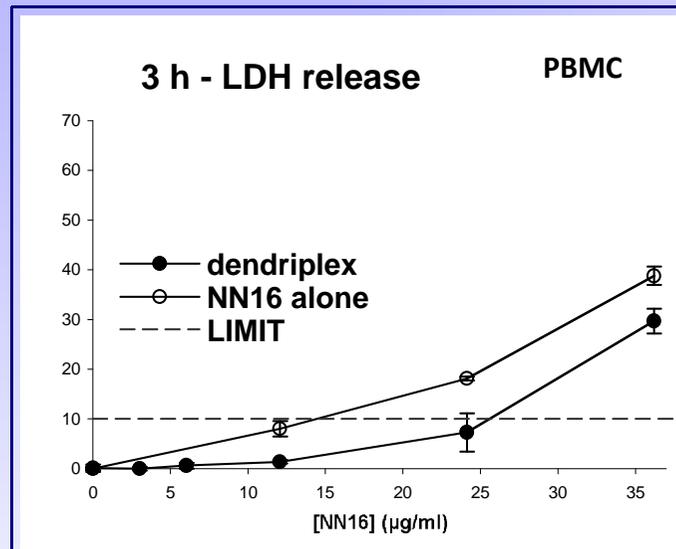
Results (after 13.5/14 ns)

Between these two alternating snaps is 0.5 ns = 250000 time steps of the MD simulation.



Resultados

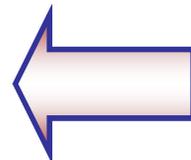
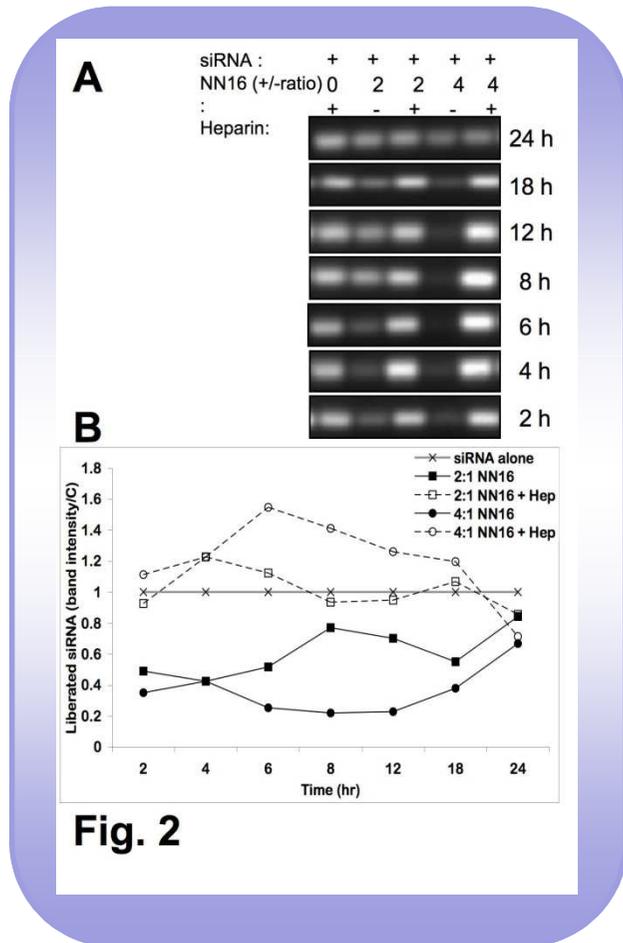
Citotoxicidad de los dendrímeros



Dendriplex produce **menos toxicidad** que el dendrímero indicando que la toxicidad es puede Ser debido a la alto número de cargas positivas

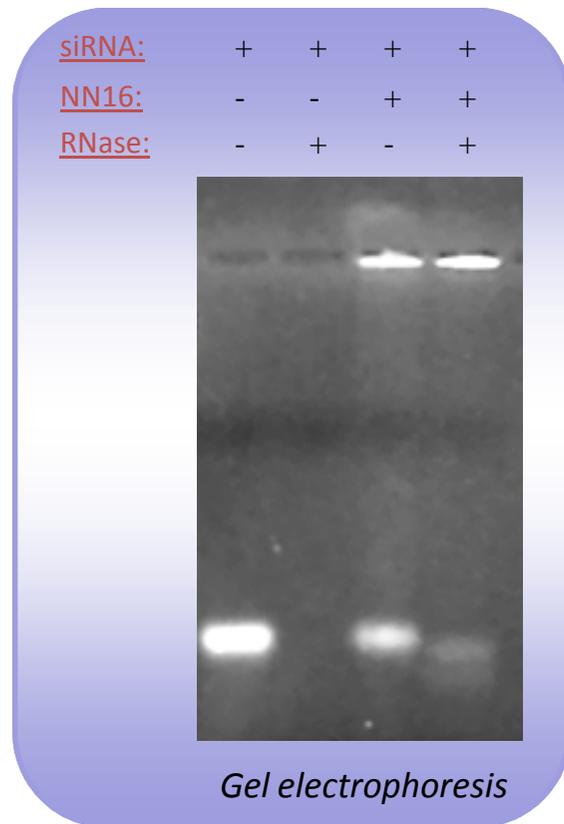
Resultados

Cinética de interacción



Tiempo gradual de degradación del dendrímero y liberación del siRNA 12 a 24 h

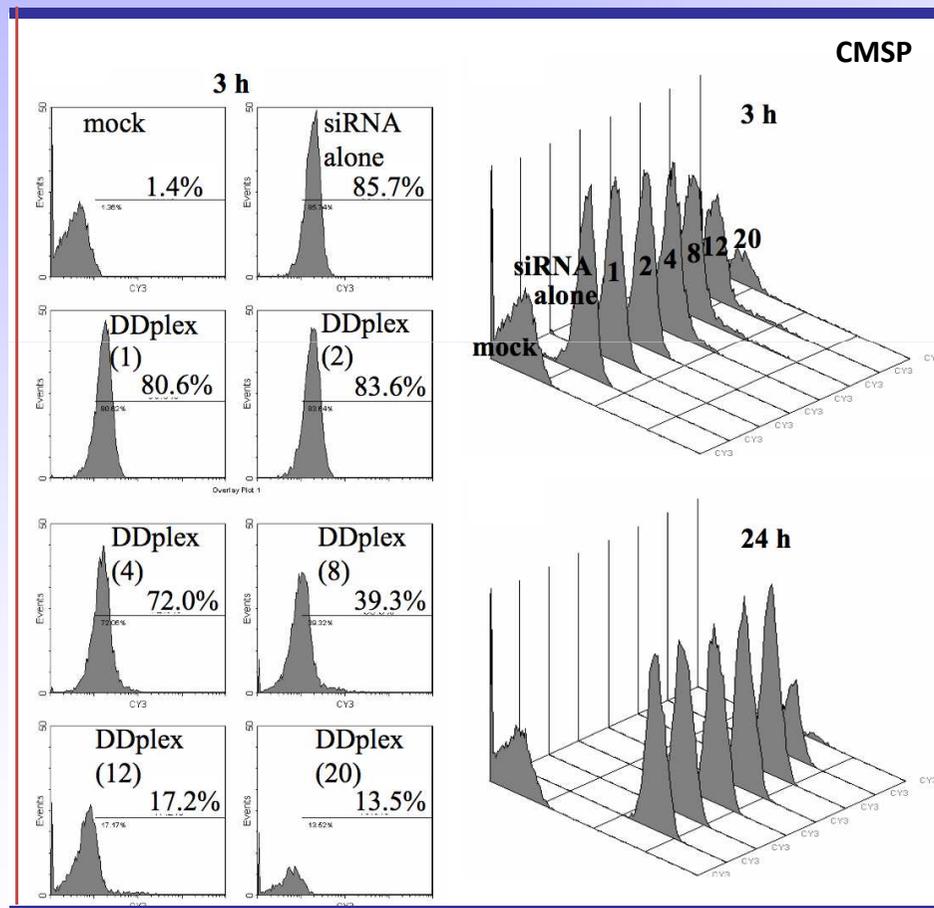
Resultados



El siRNA es completamente degradado en presencia de Rnasa. Sin embargo, el siRNA retenido en el pocillo debido a su unión con el CBS no presenta signos de degradación.

Resultados

Eficiencia de transfección dendriplexes: CBS/siRNA



La mayor eficiencia de transfección se observó a un ratio 2:1 de carga

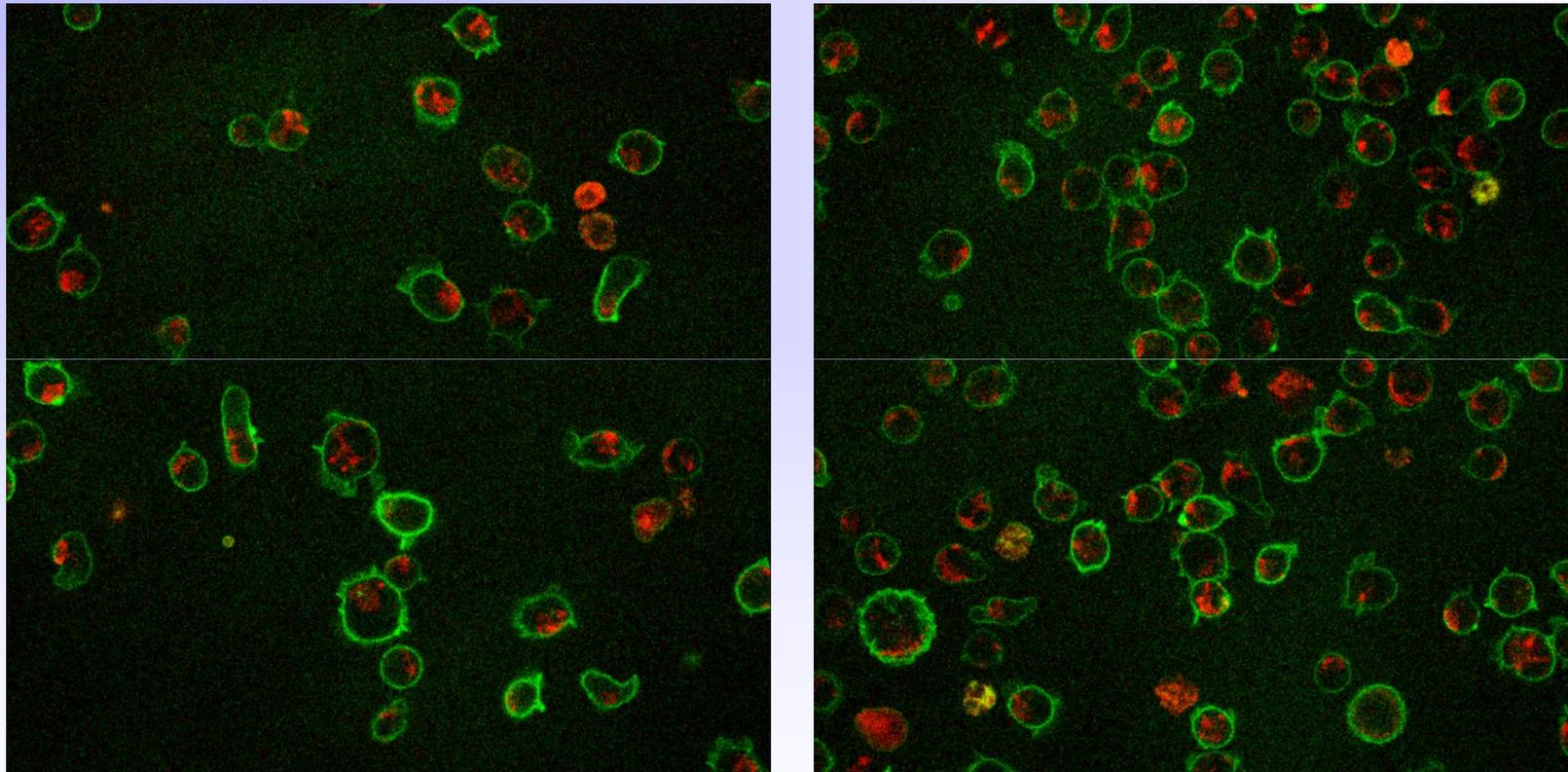
Mayores ratios producen menor eficiencia de transfección y disminuye el número de células viables debido a la toxicidad.

El porcentaje de células trasfectadas tras el tratamiento con siRNA fue del 100%, indicando que una gran cantidad de siRNA está en el interior de las células.

Entrada del dendriplex: citometría de flujo

Resultados

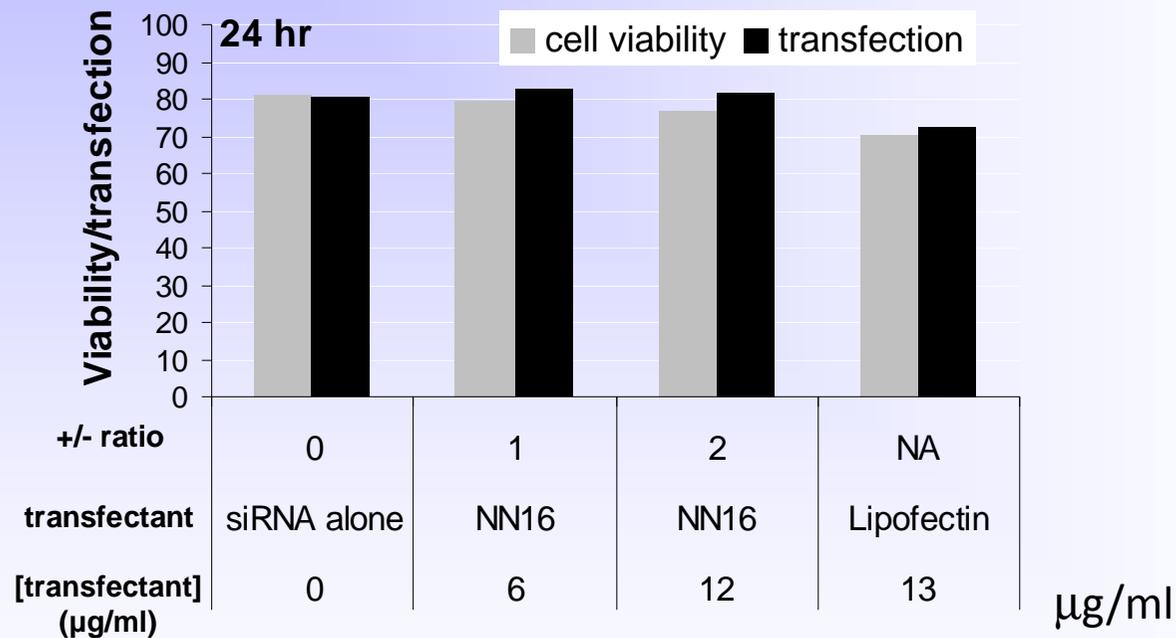
Eficiencia de transfección dendriplexes: CBS/siRNA



Microscopia confocal: siRNA se observa claramente en el interior de las células

Resultados

Toxicidad y eficiencia de la transfección en células T infectadas por el VIH



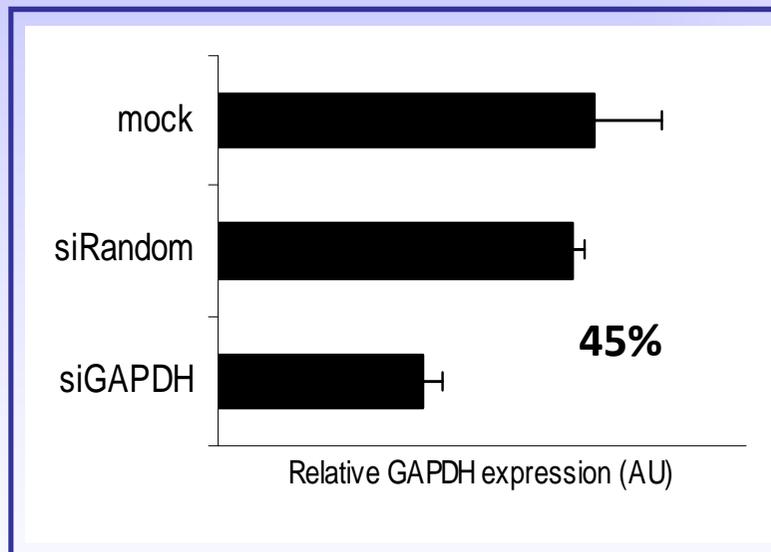
Alta eficiencia de transfección a ratio +/- 1 and **y baja toxicidad**

Resultados

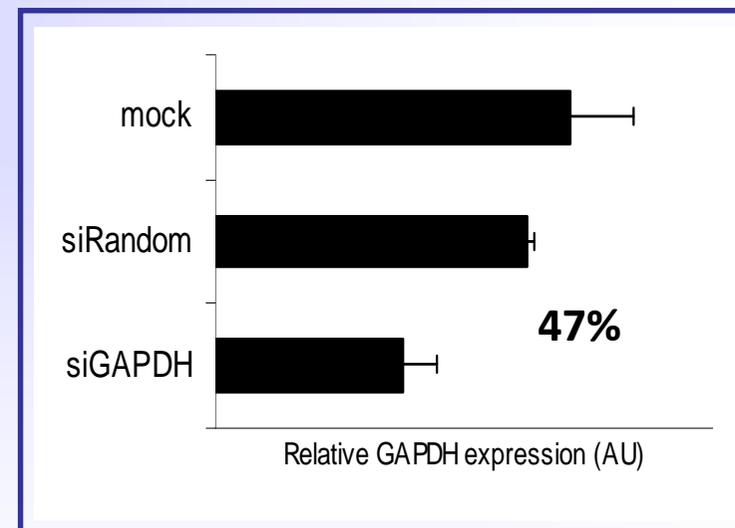
Silenciamiento de la expresión de GAPDH en SupT1 and CMSP: CBS/siRNA

Se utilizó como control positivo de silenciamiento por siRNA un gen *housekeeping* o *constitutivo* GAPDH indicando que se produce la *transfección* y que *ejerce su función*.

SupT1 NN16



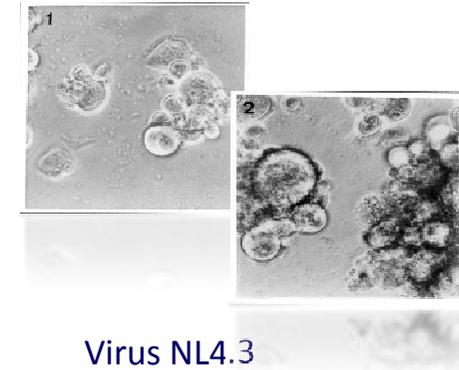
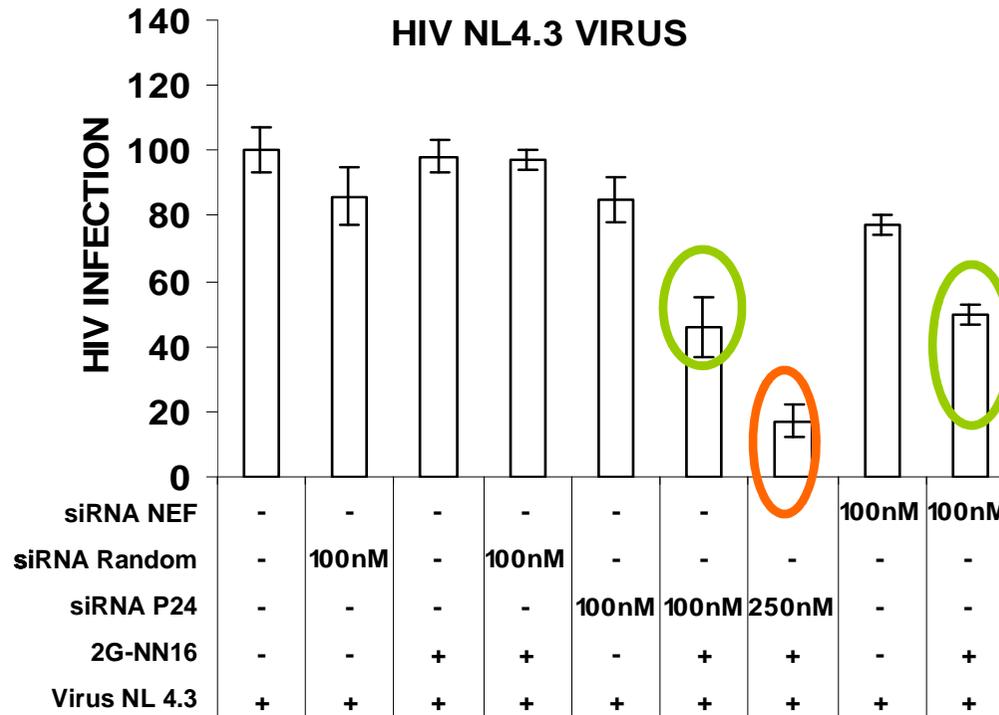
PBMC NN16



Se redujo de forma *secuencia específica* la expresión de GAPDH

Resultados

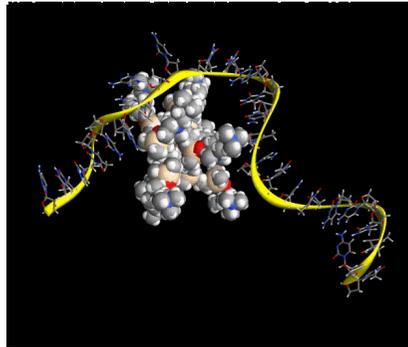
Inhibición de la replicación de VIH en CMSP-infectadas: CBS/siRNA



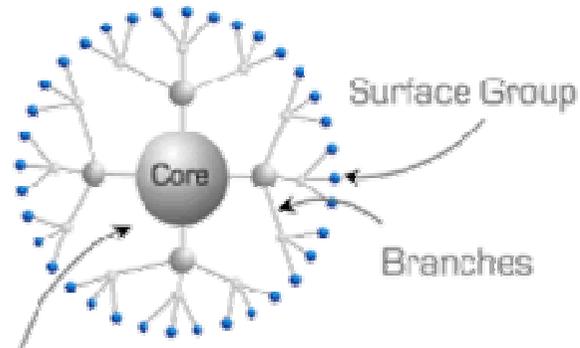
Weber N, Ortega P, Clemente MI, Shcharbin D, Bryszewska M, de la Mata FJ, Gómez R, Muñoz-Fernández MA. Characterization of carboxilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J Control Release*. 2008; 132:55-64.

Introducción

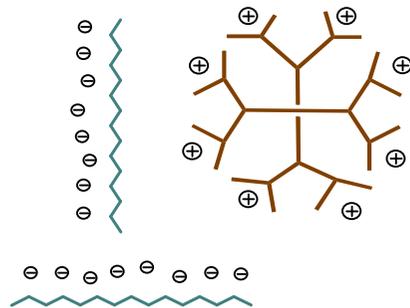
APLICACIONES:



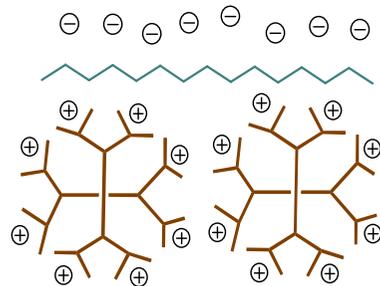
Dendrimers: Precise Nanostructures



Grupos catiónicos
Terapia Génica



Formación
Dendriplex



Novel water-soluble carbosilane dendrimers: Synthesis and biocompatibility.

Ortega P, Bermejo JF, Chonco L, et al.

European Journal of Inorganic Chemistry. 2006; 7:1388-96.

Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes.

Weber N, Ortega P, Clemente MI, et al.

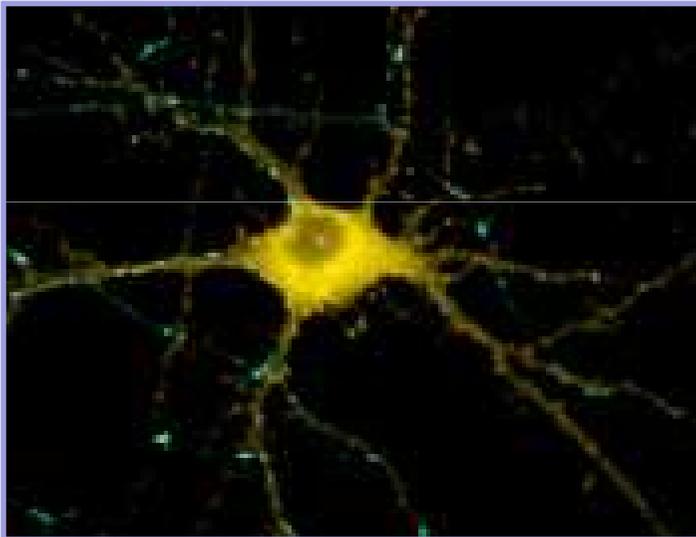
J Control Release. 2008; 132:55-64.

Gene therapy in HIV-infected cells to decrease viral impact by using an alternative delivery method.

Gonzalo T, Clemente MI, Chonco L, Weber ND, et al.

ChemMedChem. 2010 Jun 7;5(6):921-9.

Introducción



U-87MG línea celular astrocytoma

Aproximadamente el 20-30% de pacientes infectados por el VIH desarrollan demencia asociada al VIH (HAD) y aunque la TARGA reduce su incidencia, aún persiste una forma leve.

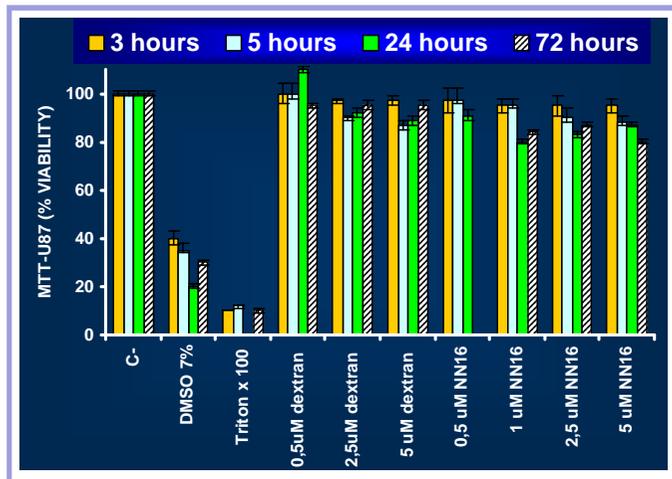
En la era TARGA, los pacientes viven mas y ha incrementado la prevalencia del VIH asociada a desórdenes neurológicos.

HAD es la principal causa de demencia En personas menores de 60 años.

No se dispone de una terapia efectiva para HAD

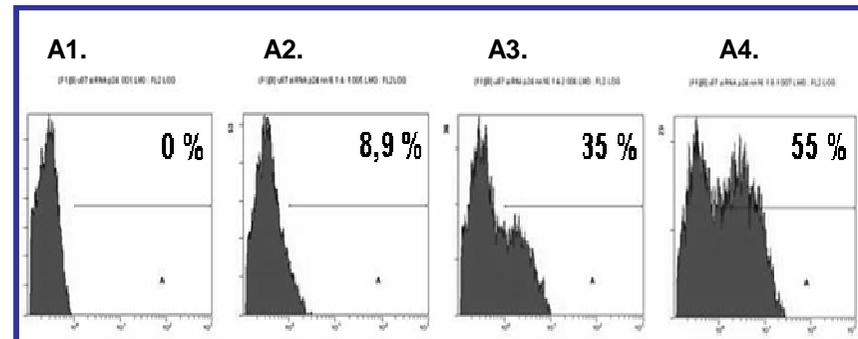
Solamente algunos nucleósidos que inhiben el VIH atraviesan la barrera hemato encefálica.

Resultados

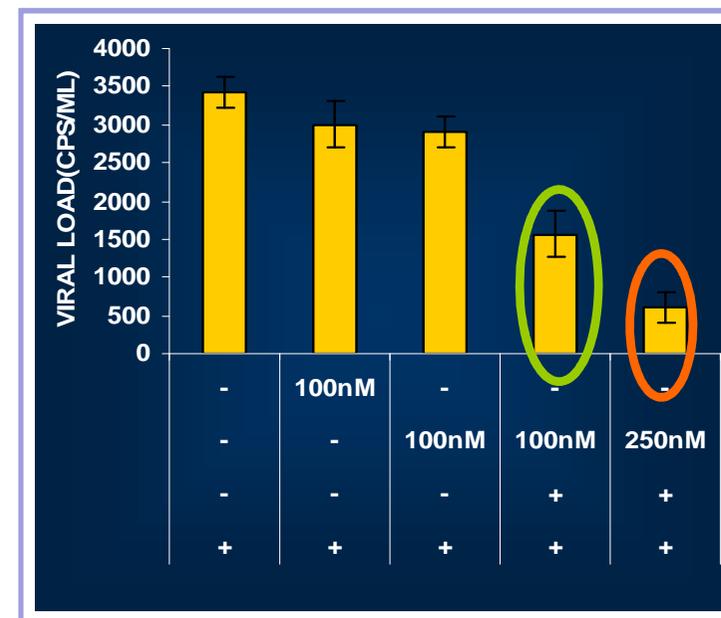


<5µM

U-87MG Astrocytoma



siRNA Random
siRNA p24
2G-NN16
Virus NL4.3

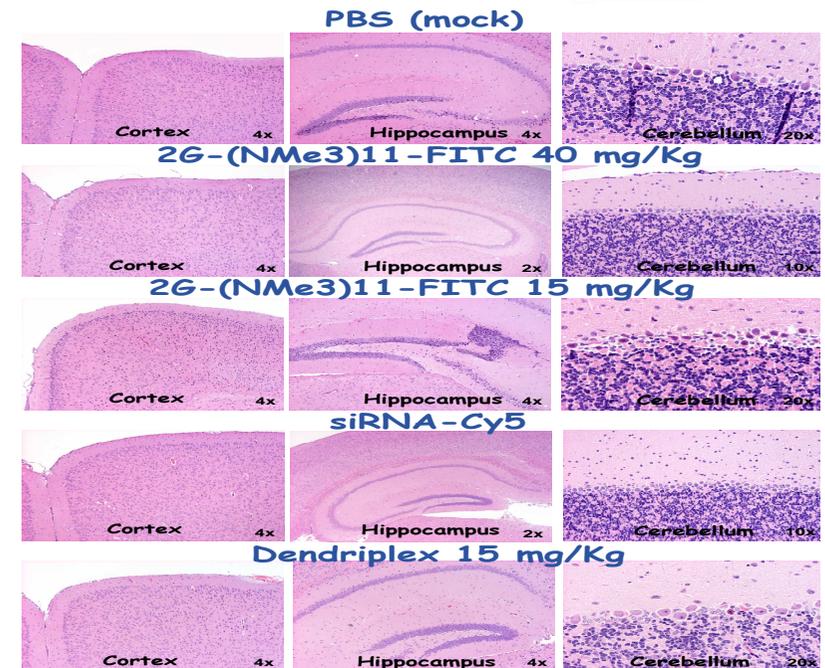
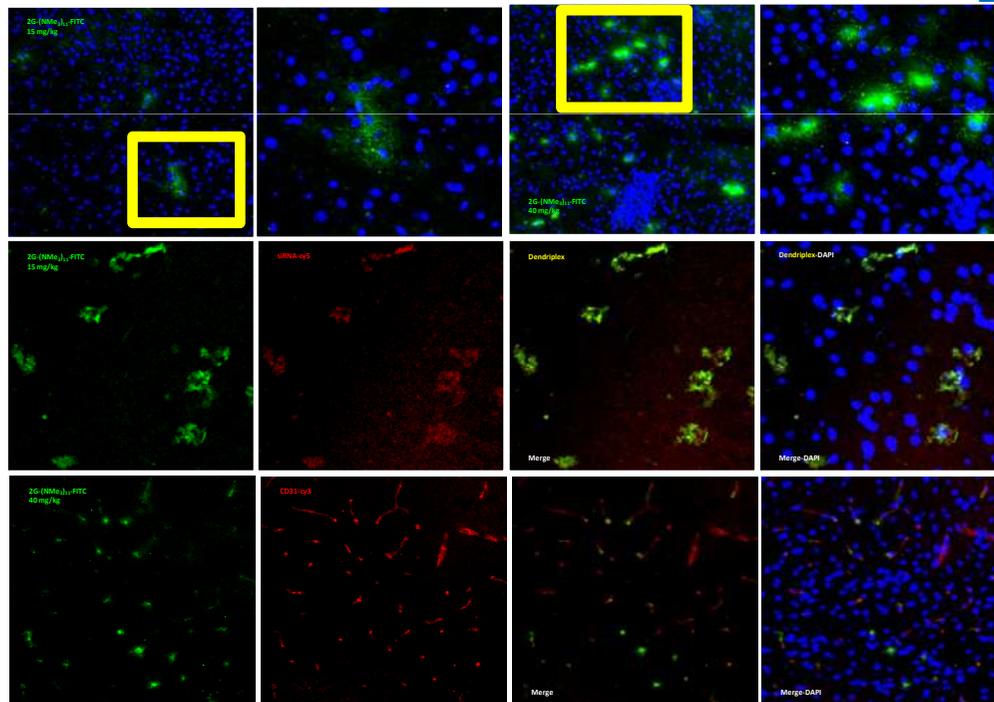
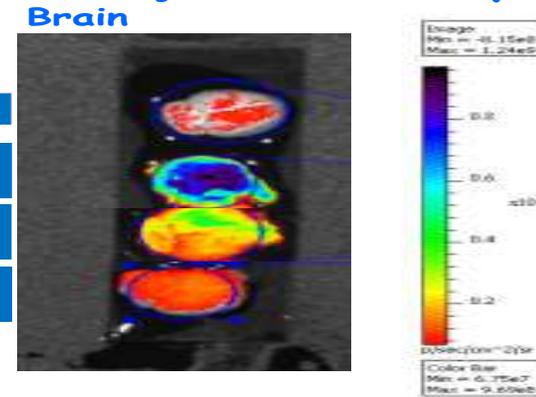


Resultados

2G-(NMe₃)₁₁-FITC uptake "in vivo". Distribution of dendrimer (40 and 15 mg/Kg) and dendriplex 2G-(NMe₃)₁₁-FITC/siRNA-cy5 (15 mg/Kg/ 2,7 μM) in brain of BALB/c mice after 1 h of administration. A) Via of inoculation. B) IVIS system in brain. C) Confocal microscopy analysis of tissue sections. CD31 (PECAM-1) was used as marker of endothelial cells, and DAPI for labeling the nucleus. D) Histological examination of changes in mouse brains injected with dendrimer or dendriplex.



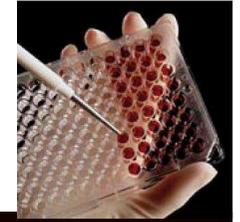
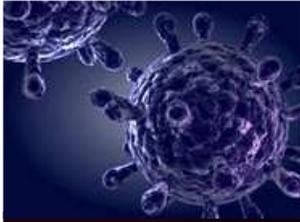
PBS (mock)
 2G-(NMe₃)₁₁-FITC 40 mg/Kg
 2G-(NMe₃)₁₁-FITC 15 mg/Kg
 Dendriplex 15 mg/Kg



Resultados

Estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar dendrimeros, por ejemplo CBS para **liberar y transfectar siRNA** dentro de los linfocitos y células del SNC, permitiendo la utilización de **siRNA como una terapia génica en distintas enfermedades.**

En ratón lo hemos detectado en **bazo, hígado, riñón** y lo mas interesante es que el dendriplex (dendrimero/siRNA) atraviesa BBB ya que lo hemos detectado en el cerebro.

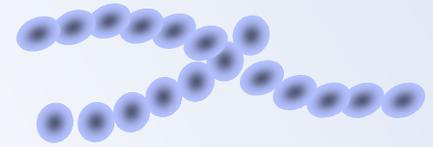


BioBanco VIH HGM

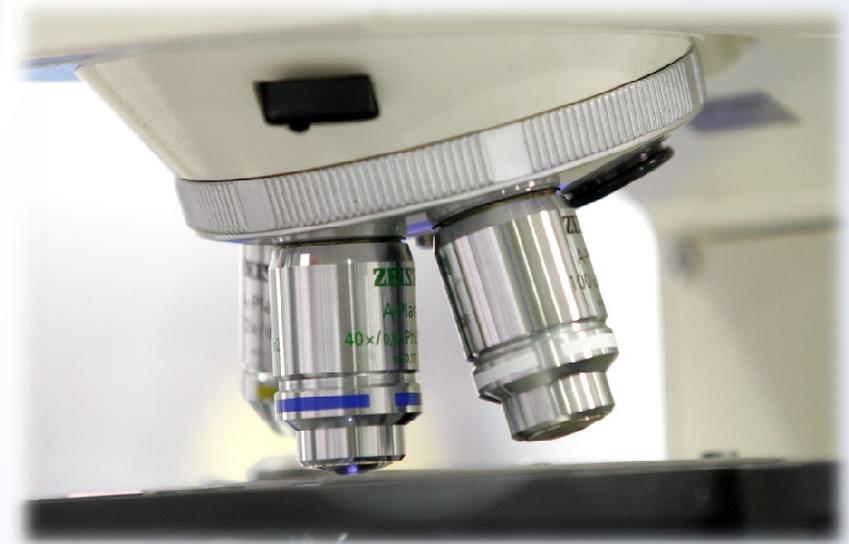
M^a Angeles Muñoz-Fernández
Directora del BioBanco VIH HGM
Hospital General Universitario
Gregorio Marañón



OBJETIVOS DEL BIOBANCO



- Contribuir al avance del conocimiento científico en múltiples patologías.
- Ceder, para fines investigadores, muestras biológicas de pacientes. Estas muestras son depositadas procesadas, codificadas y criopreservadas en el BioBanco.



Microscopio óptico
Fuente: SINIC

INFRAESTRUCTURAS I

El BioBanco consta de una sala de criopreservación

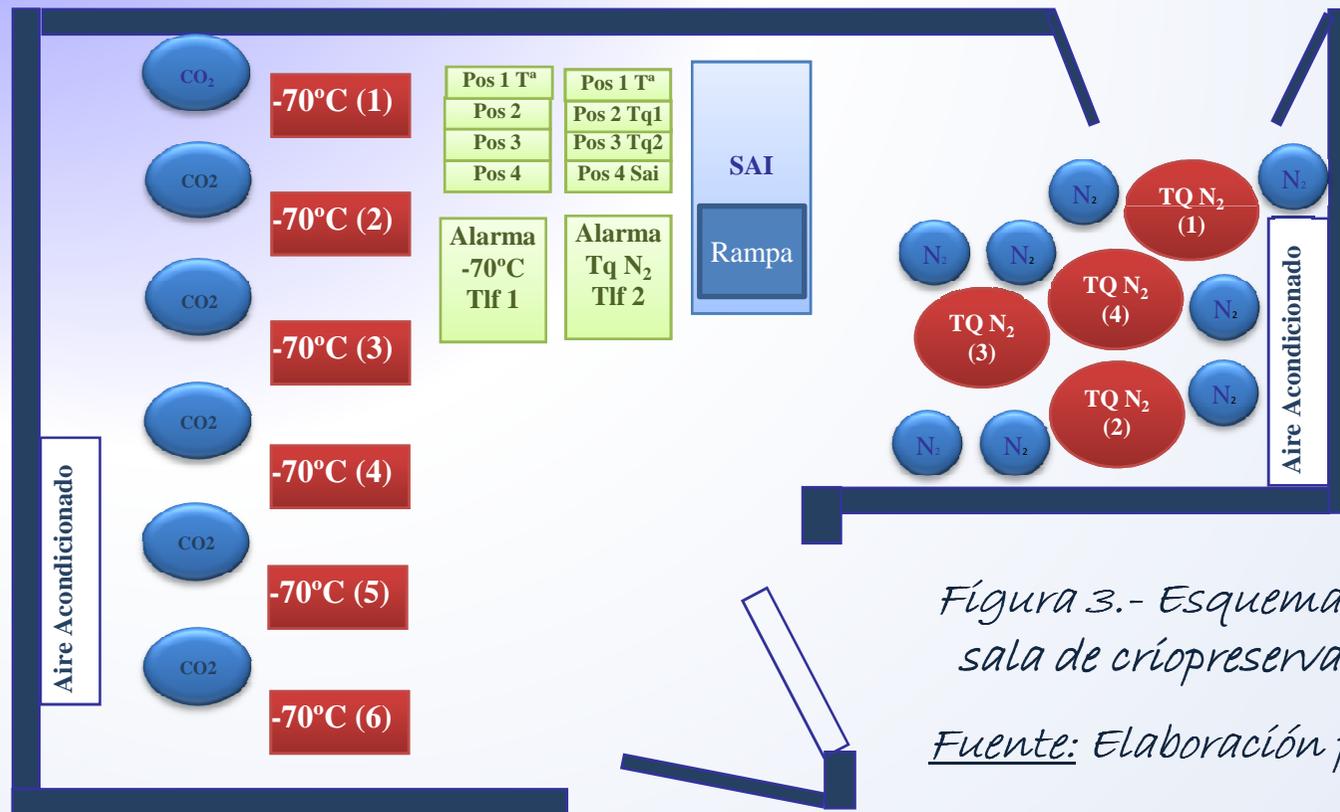
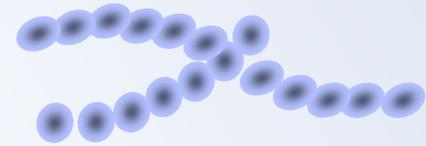


Figura 3.- Esquema de la sala de criopreservación

Fuente: Elaboración propia

INFRAESTRUCTURAS II



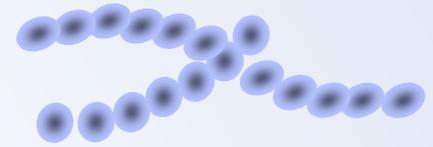
En marzo del 2007 se amplía el espacio del BioBanco y se crea un laboratorio para el procesamiento de muestras

Figura 4.- Esquema del Laboratorio de procesamiento de muestras

Fuente: Elaboración propia



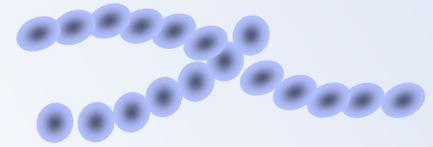
LEGISLACIÓN ESPECÍFICA I



En el BioBanco se almacenan muestras tanto de mayores de edad como de menores.

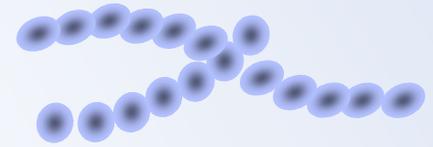
Para los mayores de edad se han diseñado varios modelos de consentimiento informado, siguiendo las recomendaciones, tanto del Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, como de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, y de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

LEGISLACIÓN ESPECÍFICA II



En el caso de los menores de edad, y siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, se ha establecido que los padres o tutores firmen el consentimiento y si el niño es mayor de 12 años y es consciente de su patología, éste también debe firmar el asentimiento informado (documento similar al consentimiento pero redactado en términos más sencillos y comprensibles para el menor).

FUNCIONAMIENTO



Cohorte/Estudio y BioBanco firman acuerdo de depósito

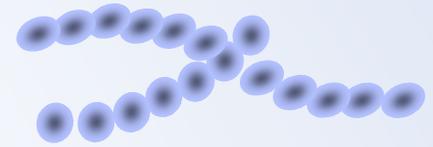
Clínico envía muestras al BioBanco

BioBanco recepciona, registra, procesa y criopreserva muestras

Consolidación datos de muestras con cohortes/estudios y clínicos

BioBanco cede muestras a proyectos aprobados por los comités científico y ético

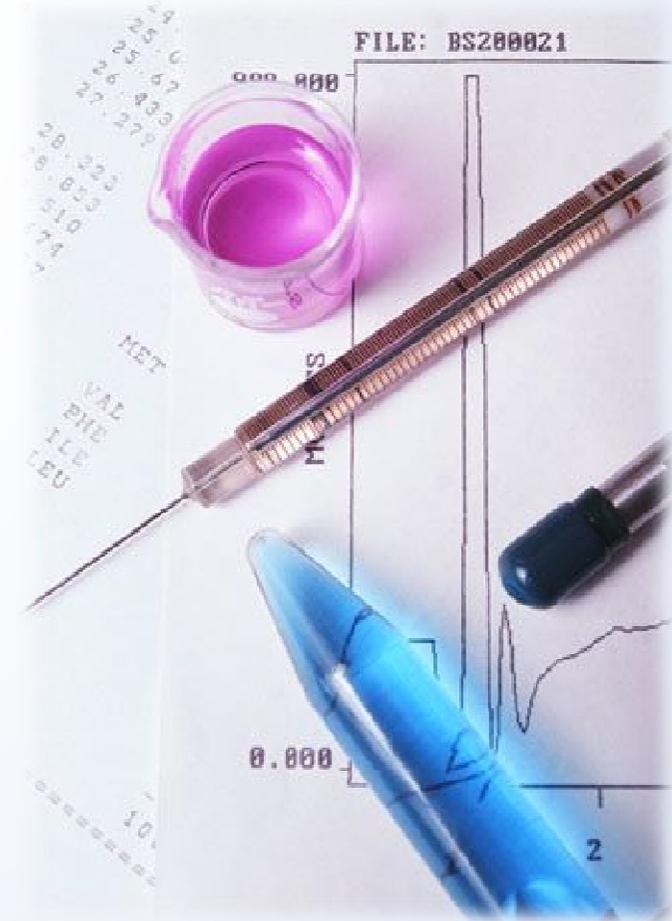
Acuerdo de depósito



- Acuerdo de depósito: directrices para el envío de muestras al BioBanco

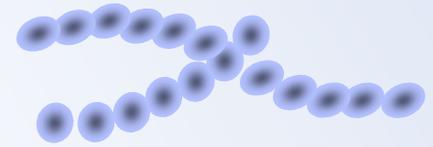
- Dirección del BioBanco y Coordinadores de cohorte/estudio: Firman el acuerdo de depósito

- Envío del Kit de iniciación a los clínicos (documentos y formatos necesarios para extracción y envío de muestras).



Fuente: <http://www.gettyimages.com>

Envío de muestras I

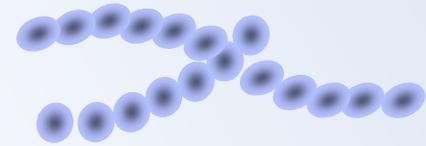


Clínico y BioBanco conciertan fecha de extracción y envío



Clínico: consentimiento/asentimiento informado, extracción de muestra, envío de muestra y datos asociados

Envío de muestras II



CoriS
Comisión de la Ética de Investigación en SIDA

CONSENTIMIENTO

CONSENTIMIENTO POR ESCO

OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA SU PRO
ALMACENAMIENTO EN EL BIOBANCO VIH, OB
CLÍNICOS Y ANALÍTICOS PARA SU REGISTRO E
MUESTRAS Y DATOS CLÍNICOS CON FINES I
YO,

Declaro que:

1. He leído la Hoja de Información que me ha sid
2. He podido hacer preguntas sobre la obtenci
almacenamiento en el BioBanco VIH y el análi
sobre la cesión de datos clínicos y analíticos a (
3. He hablado y he aclarado las dudas con el Dr...
4. Entiendo que mi participación es voluntaria.
5. Comprendo que puedo solicitar la destrucción
información clínica en cualquier moment
explicaciones y sin que esto repercuta en mis c

Por favor, firme donde proceda:

- Doy mi consentimiento para que se me realice
biológico y el almacenamiento de sus componentes

Fecha: Nombre del participante:



CoriS
Comisión de la Ética de Investigación en SIDA

CONSEN

- Doy mi consentimiento para la cesión
estipulado en esta Hoja de Información

Fecha: Nombre del participante:

- Si usted desea incluir alguna restricción
a continuación.

- Quiero ejercer mi derecho a no ser info
estudios realizados con mis muestra
hallazgos tengan una implicación s
posibilidad real de mejora (firmar sólo

Fecha: Nombre del participante:

(A firmar por el personal que informa al
obligatoria)

Fecha: Nombre del investigador que



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón

OFICINA TÉCNICA - COMITÉ DE ÉTICA
DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN

30 ENE. 2009

Comunidad de Madrid



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Fernando Díaz Otero, Secretario del COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA - ÁREA 1

CERTIFICA

Que ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

TÍTULO: "BioBanco RIS, auspiciado por la Plataforma Red de Laboratorios de la Red Española de Investigación
en SIDA G03/G3"

PROMOTOR: Investigador

considera que:

- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado y el asentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, así y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Además, el citado CEIC cumple las normas de BPC (CPMP / ICH / 135 / 95).

Este CEIC acepta que la Hoja Consentimiento Informado y la Hoja de Asentimiento Informado para depositar muestras
biológicas en el BioBanco presentado para su evaluación sea empleado por los pacientes correspondientes.

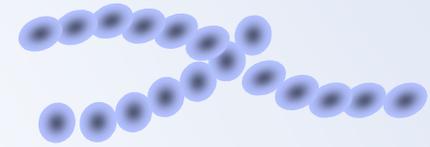
Lo que firmo en Madrid, a 29 de enero de 2009

Firma Dr. Fernando Díaz Otero

SE: _____ CE: _____ CR: _____

© 2008 - Escarabajo de Rubén de Osma, Plataforma RED Madrid
cec@ceicmadrid.com - Tel: 91 686 10 07 - Fax: 91 403 17 10

Procesamiento



- Se registran y comprueban los datos asociados a las muestras.

- Procesamiento:

- Sangre: ST, plasma pellet, CMSP y ADN
- Bazo: CMSP
- Hígado: biopsia congelada
- Moco: pellet y sobrenadante

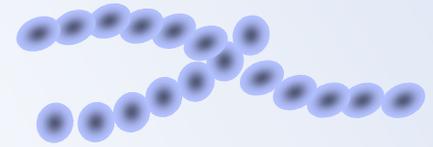
- Criopreservación



Procesamiento de muestras

Fuente: SINC

Consolidación de datos



BioBanco envía a clínicos y cohortes/estudios información asociada a las muestras recibidas en el período a consolidar

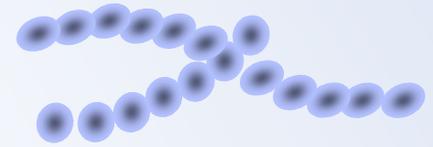


Clínicos y cohortes/estudios revisan datos y hacen correcciones



BioBanco modifica en la base de datos la información corregida

Cesión de muestras



Investigador: envía al BioBanco solicitud de cesión de proyecto aprobado por CEIC



Comité Científico y Comité Ético evalúan solicitud

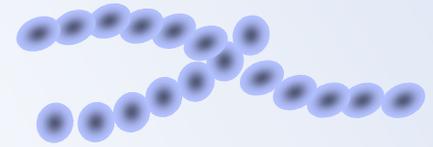


BioBanco: cesión de muestras



Investigador: Envío de memoria anual al BioBanco. Mención al BioBanco en publicaciones finalizado el proyecto/política autoría

Gestión de la calidad I



- Todos los procesos llevados a cabo en el BioBanco se realizan empleando técnicas estandarizadas y validadas, lo que permite garantizar la calidad, trazabilidad y homogeneidad de las muestras, otorgándoles un gran valor científico.
- El BioBanco cuenta con un estricto sistema de gestión, con un claro enfoque a la satisfacción del cliente, que incluye: el registro y análisis de indicadores de calidad, no conformidades y acciones correctivas, preventivas y de mejora; la revisión anual del sistema por la dirección; la recopilación de cuestionarios de satisfacción; y el control de la calidad de las muestras.

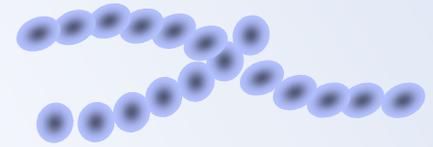
Gestión de la calidad II



- Desde 2008: Certificado en la "Norma UNE - EN - ISO 9001:2000. Sistemas de gestión de la Calidad. Requisitos"; a través de la agencia certificadora Bureau Veritas.

The image displays three overlapping copies of an ISO 9001:2008 certification certificate. The certificates are issued by Bureau Veritas Certification to the 'PLATAFORMA LABORATORIO HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN' in Madrid. The certificates confirm that the organization's quality management system conforms to the ISO 9001:2008 standard. Key details include the certificate number 0000762, the issue date of 19 March 2008, and the validity date of 11 March 2010. The certificates also mention the scope of the system, which includes a biological material repository and a laboratory platform for virology. The certificates feature the Bureau Veritas logo and the ANAB logo.

GESTIÓN DE LA INFORMACIÓN I



Muestras

Datos Clínicos

BioBanco
(datos técnicos,
biológicos y de
calidad de las
muestras)

Cohortes/estudios
(datos clínicos de
las muestras)

Clínicos
(datos clínicos y
personales de los
donantes)

Consolidaciones cada año (área VIT)

Consolidaciones cada 4 meses

GRACIAS



Leibniz-Institut
für Polymerforschung
Dresden e.V.



Universidad
de Alcalá



University of
LODZ

LCC



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón



PROYECTO COFINANCIADO
POR LA UNIÓN EUROPEA

FONDO EUROPEO DE
DESARROLLO REGIONAL



Red Española de Investigación en SIDA
Spanish AIDS Research Network

ciber-66n

Centro Investigación Biomédica en Red
Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina



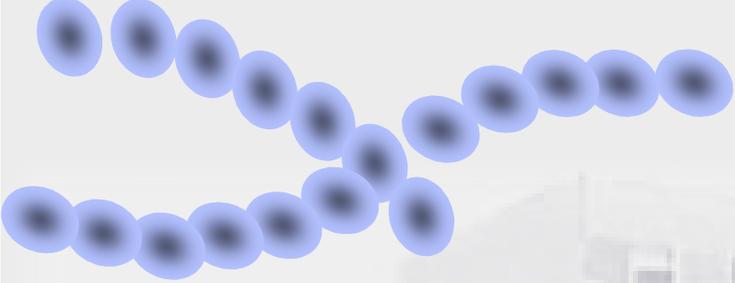
MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Instituto
de Salud
Carlos III



saludMadrid



GRACIAS POR VUESTRA ATENCIÓN

Ponente: M Ángeles Muñoz-Fernández

BioBanco

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

