

Transport de substàncies a través de la barrera hematoencefàlica mitjançant l'anticòs 8D3 dirigit contra el receptor de transferrina

**Carme Pelegrí, Itsaso Cabezón, Elisabet Augé,
Antoni Camins i Jordi Vilaplana**

Grup de Barrera Hematoencefàlica

La Barrera Hematoencefàlica (BHE)

Ehrlich P. 1885. Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus; Eine Farbenanalytische Studie. Berlin: Hirschwald

Goldman EE. 1909. Die aussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Beitr. Klin. Chir. 64:192–265

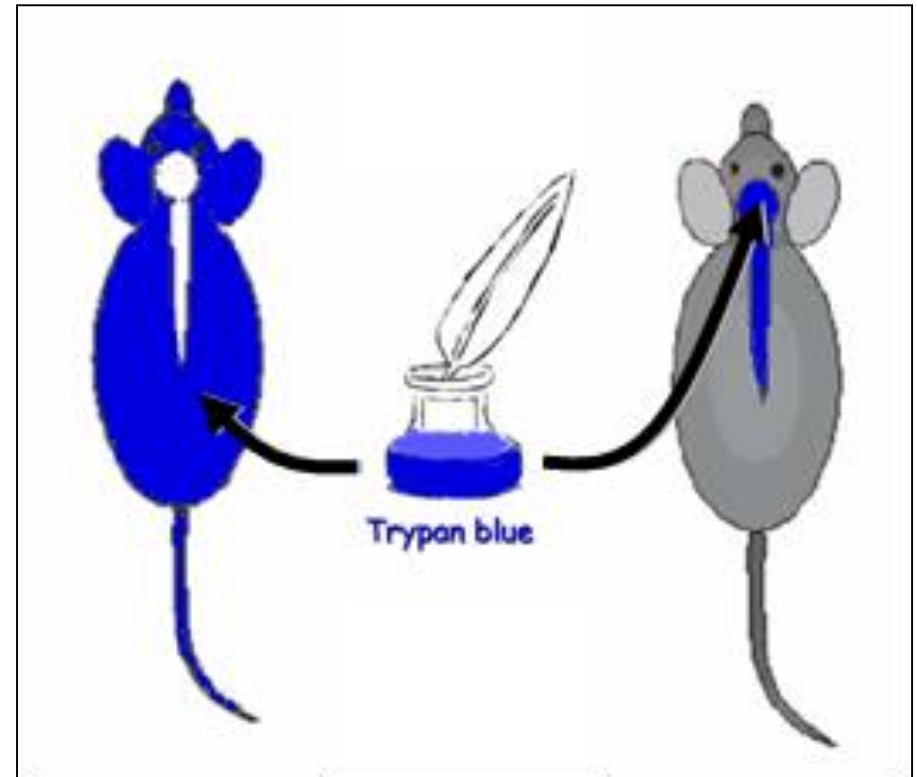
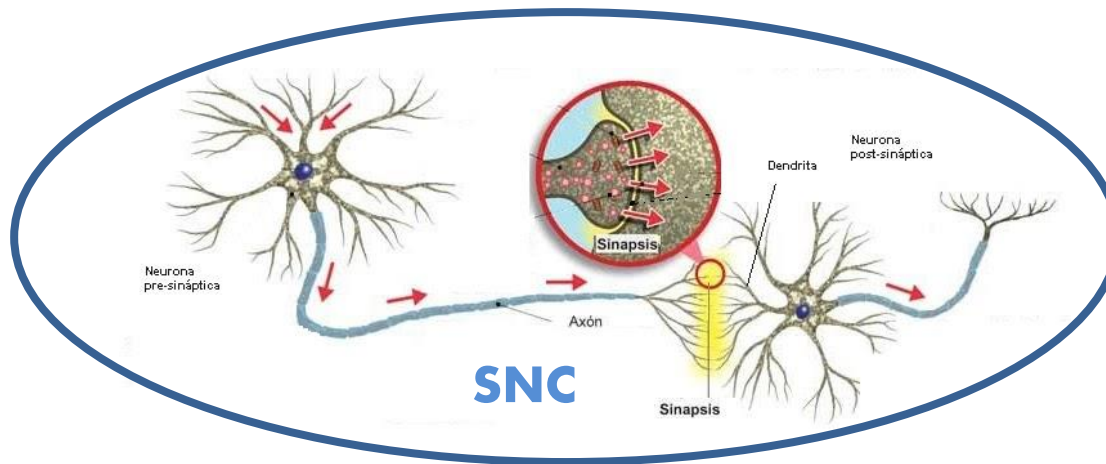


Figure 1: Goldman's staining experiment. The intravenous injection of the dye trypan blue readily stained all tissues except the brain and spinal column. However, when injected intracerebrally, the dye stained only the central nervous system.

La Barrera Hematoencefàlica (BHE)

- Manté l'**homeòstasi del SNC** regulant l'intercanvi de substàncies
 - Regulació iònica
 - Regulació del flux de neurotransmisors
 - Control d'entrada de neurotoxines
 - Entrada selectiva de nutrients



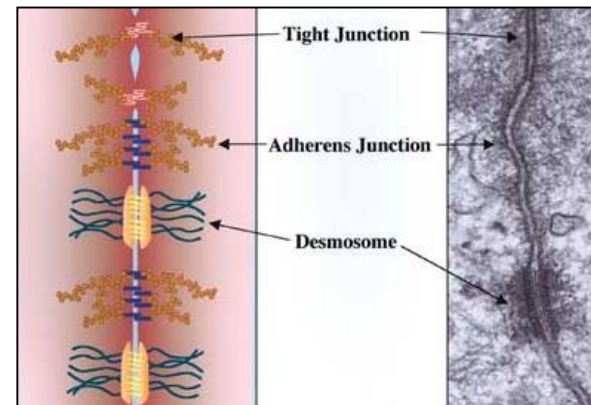
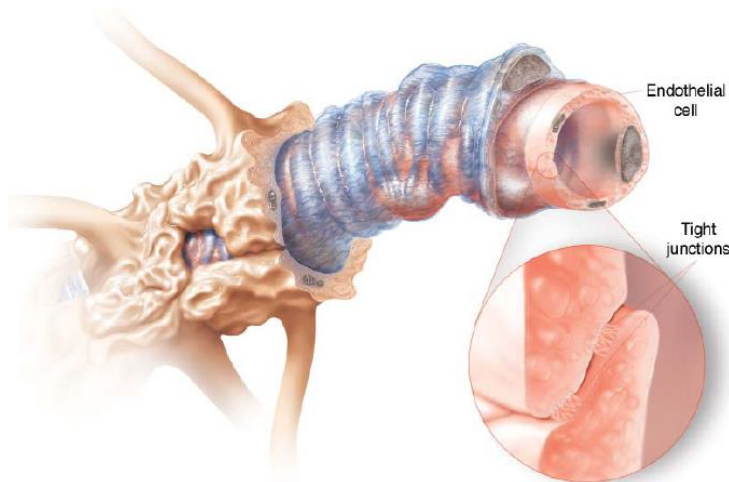
Estructura de la BHE

- Cèl·lules endotelials dels capil·lars sanguinis cerebrals



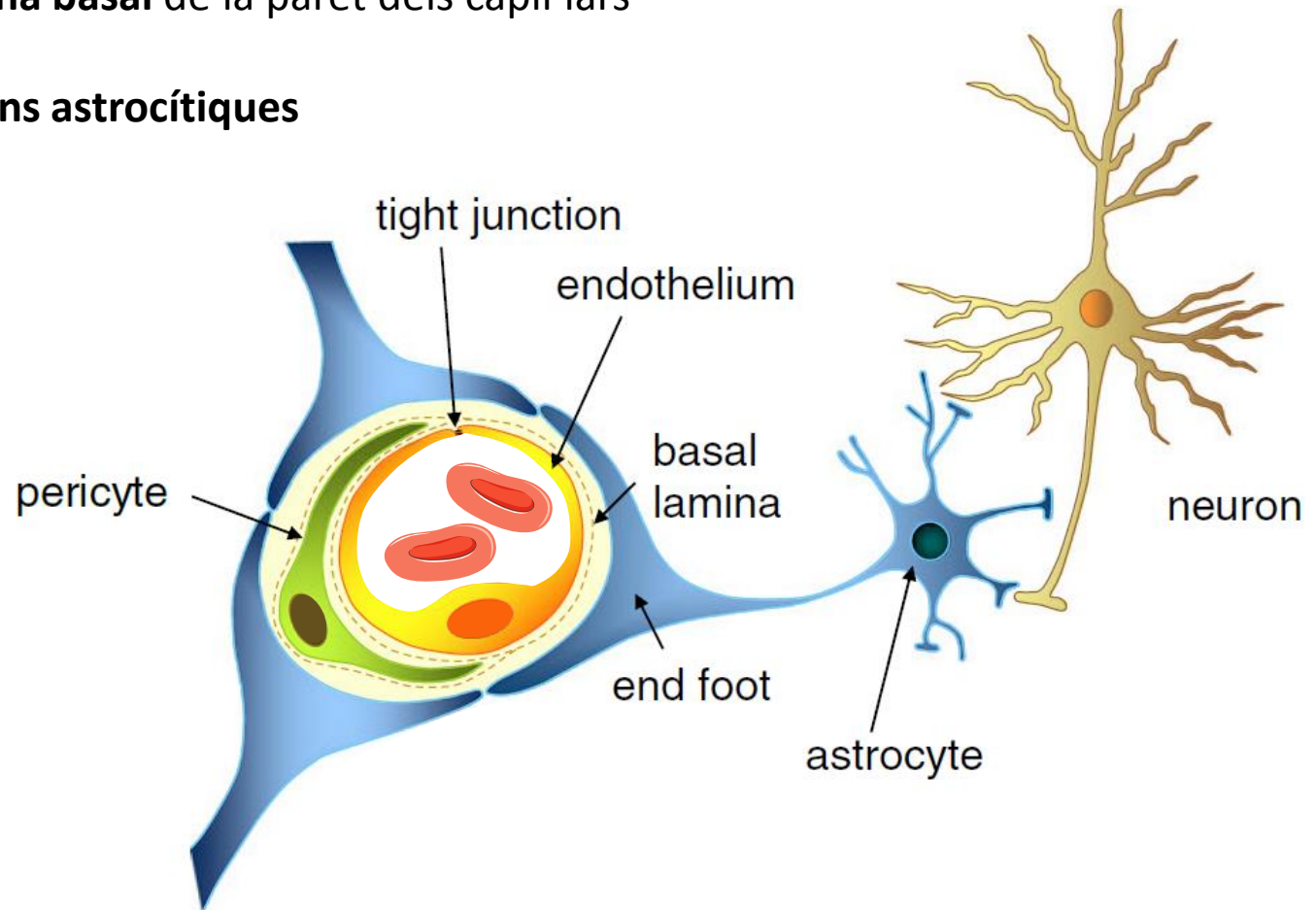
- 600 km de longitud
- 20 m² de superfície
- Cada neurona té un capil·lar proper (8-25 µm)

Elevat nombre de **tight junctions** entre les cèl·lules endotelials

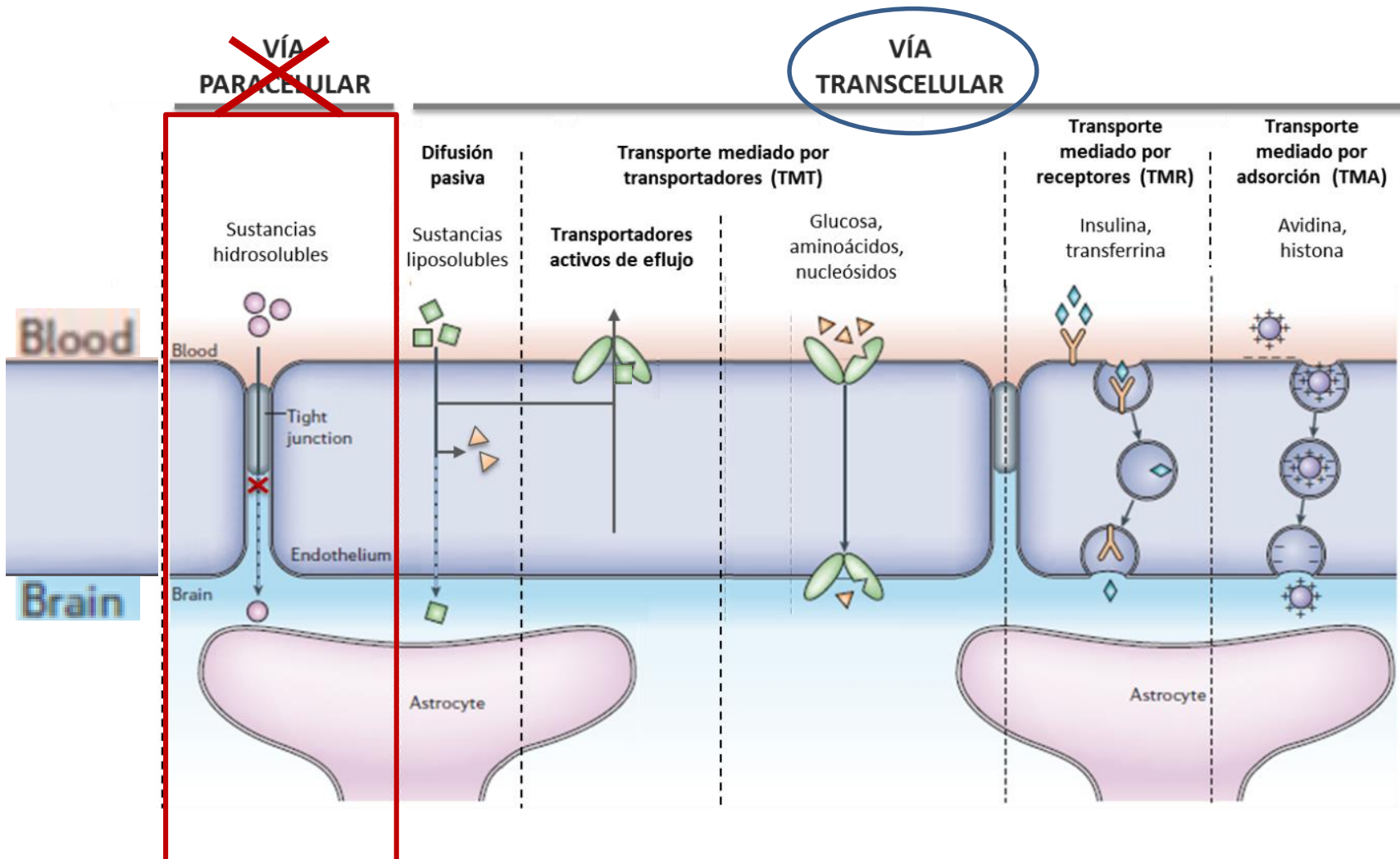


Estructura de la BHE

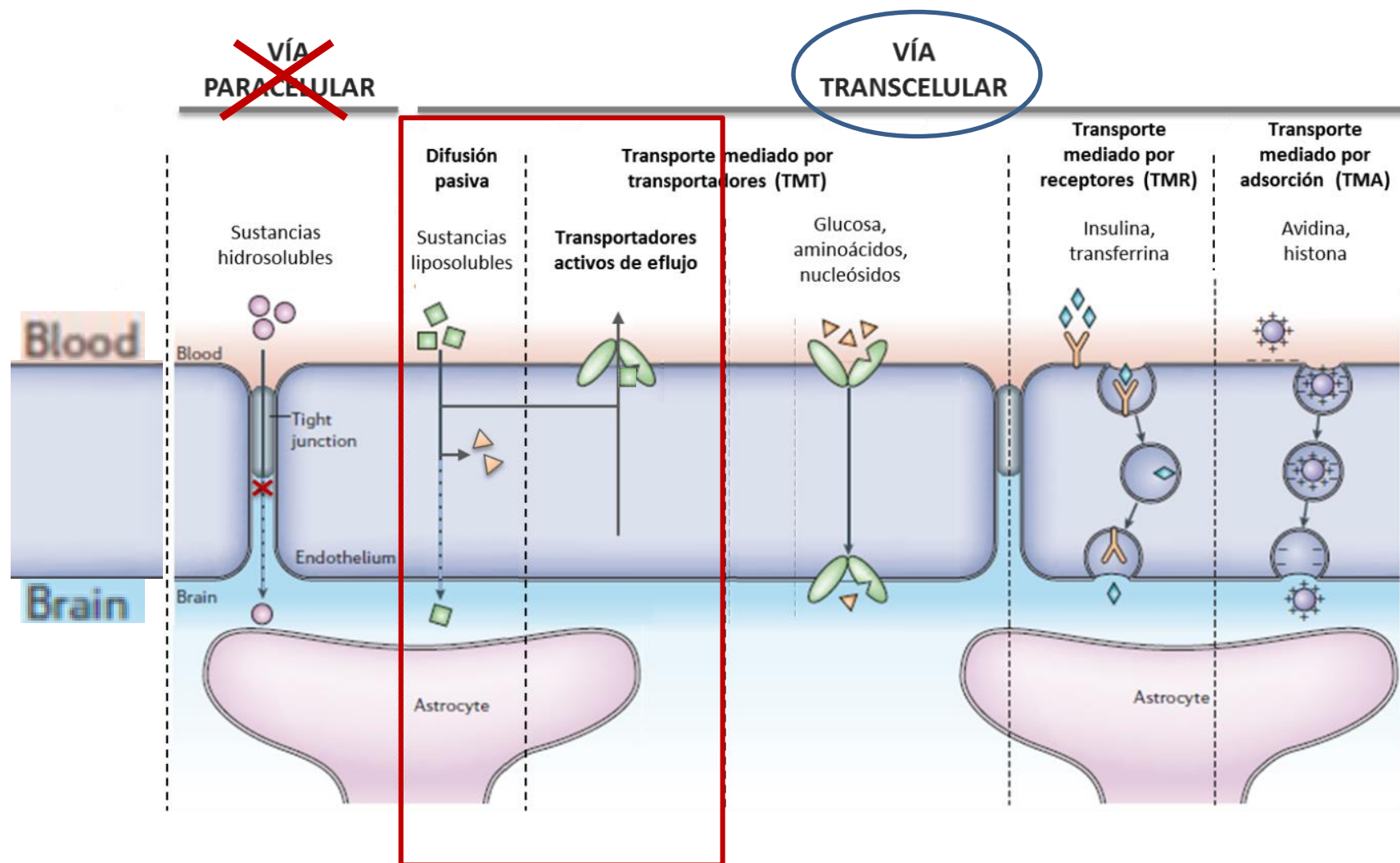
- **Cèl·lules endotelials** dels **capil·lars** sanguinis cerebrals
- **Membrana basal** de la paret dels capil·lars
- **Pericits**
- **Digitacions astrocítiques**



Intercanvi de substàncies a través de la BHE



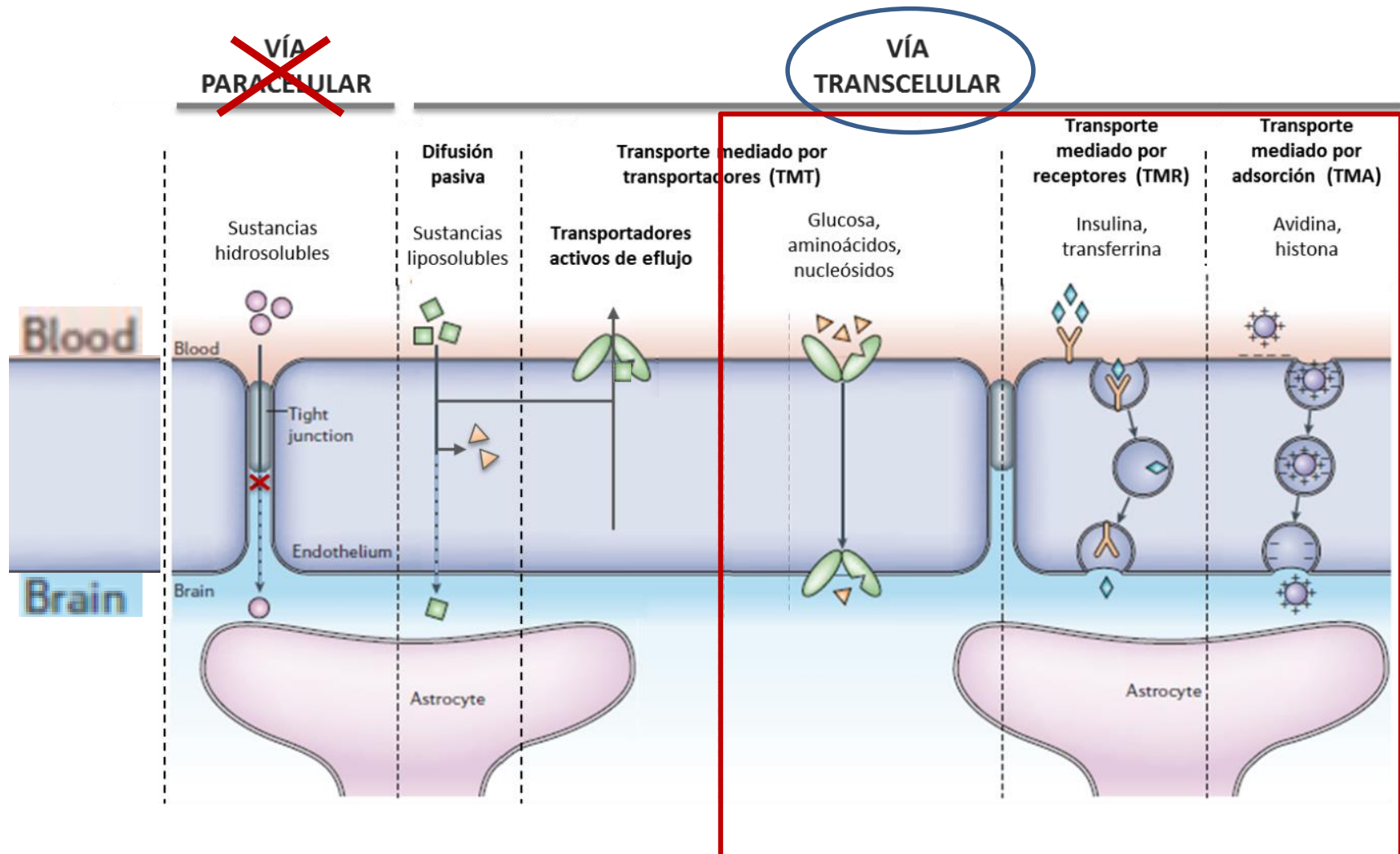
Intercanvi de substàncies a través de la BHE



Molècules lipòfiles <500 Da

Adapted from Abbott *et al.* 2006

Intercanvi de substàncies a través de la BHE



BHE: funció protectora VS factor limitant

La BHE limita l'accés de fàrmacs al parènkima cerebral

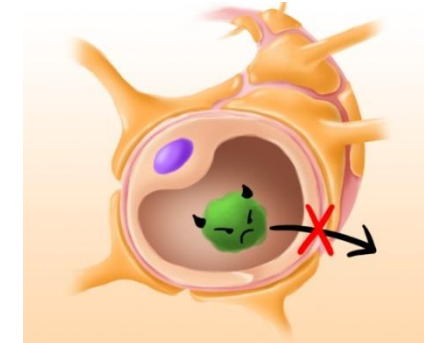
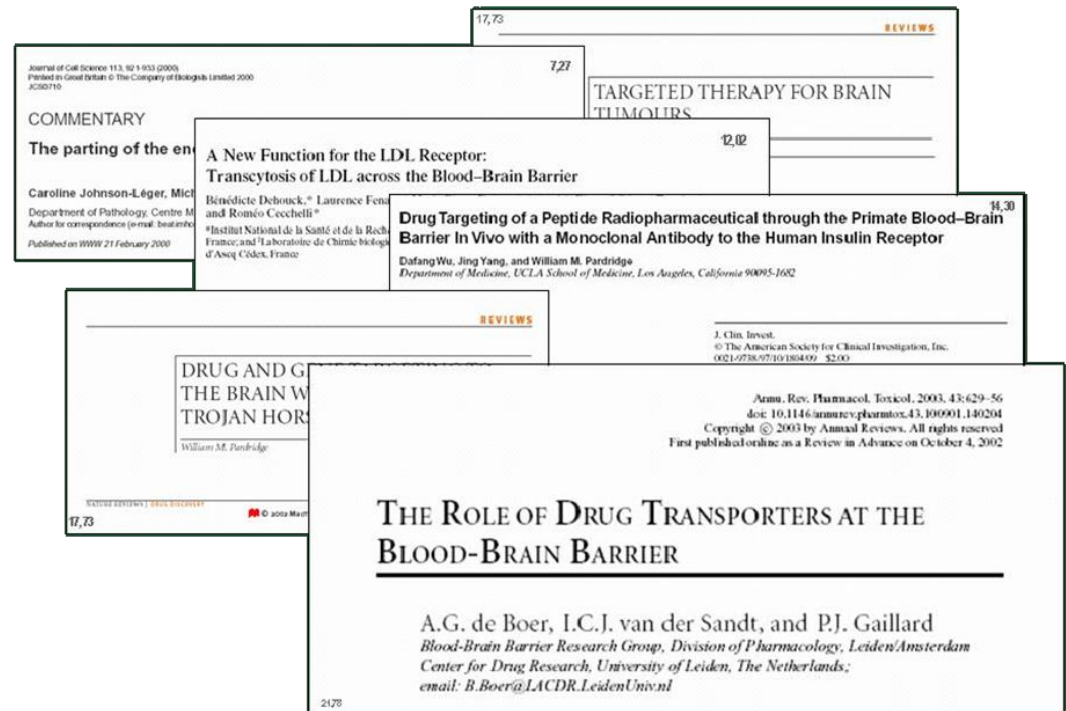


Table 1. Brain disorders responsive to small molecule drugs

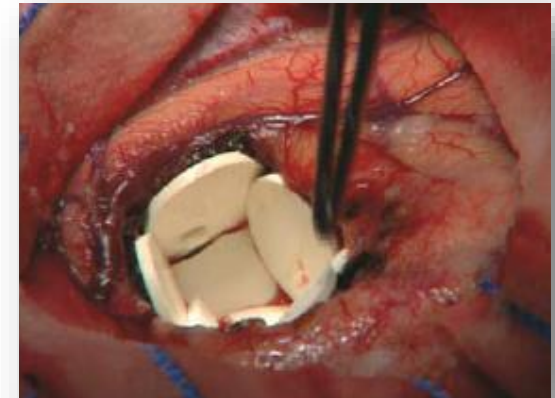
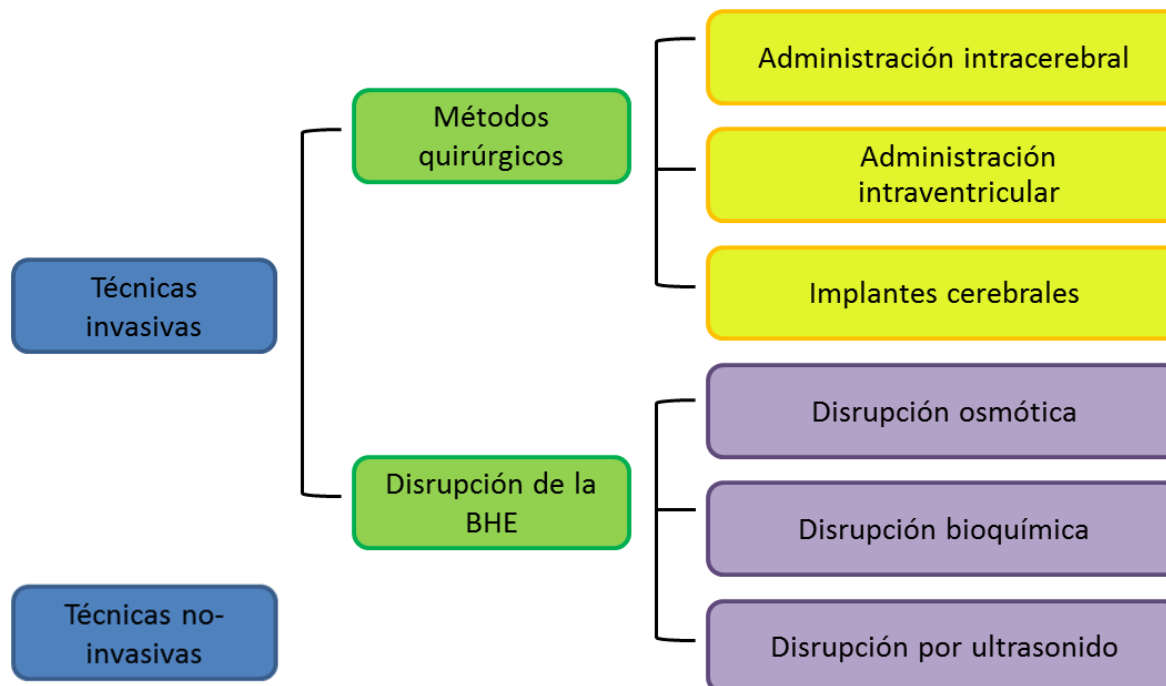
depression
schizophrenia
chronic pain

Table 2. Brain disorders refractory to small molecule drugs

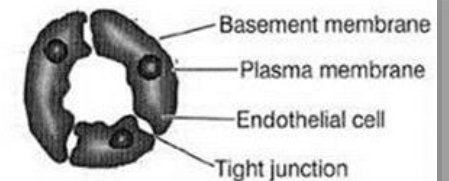
Alzheimer's disease
Parkinson's disease
Huntington's disease
A.L.S.
multiple sclerosis
neuro-AIDS
brain cancer
stroke
brain injury; spinal cord injury
autism
lysosomal storage disorders



Tècniques per a distribuir fàrmacs al cervell



NORMAL CAPILLARY



OSMOTIC SHRINKAGE



Tècniques per a distribuir fàrmacs al cervell

Tècniques
invasives

Tècniques no-
invasives

Modificació
química

Administración
intranasal

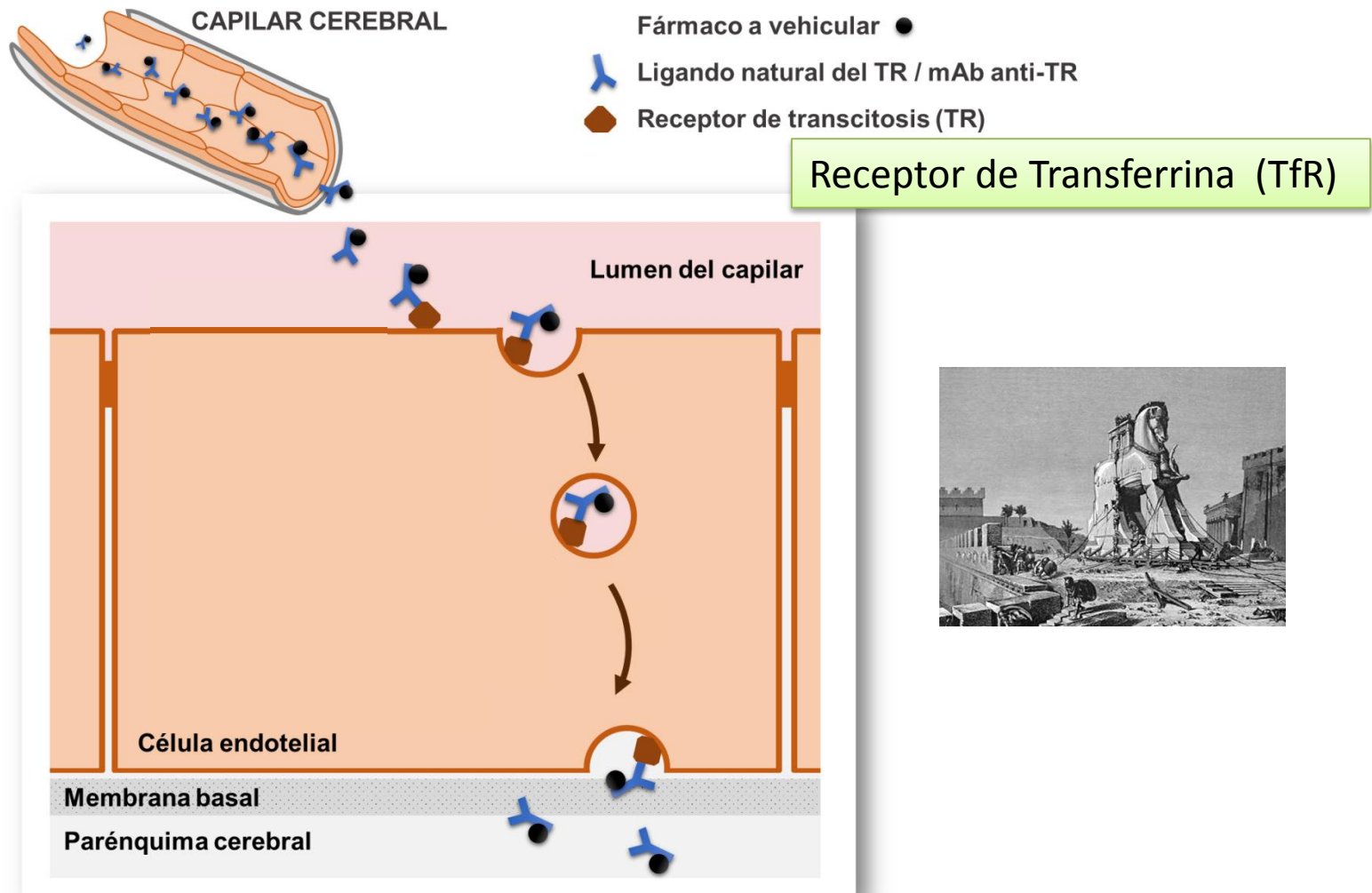
Vectores
moleculares

TMA

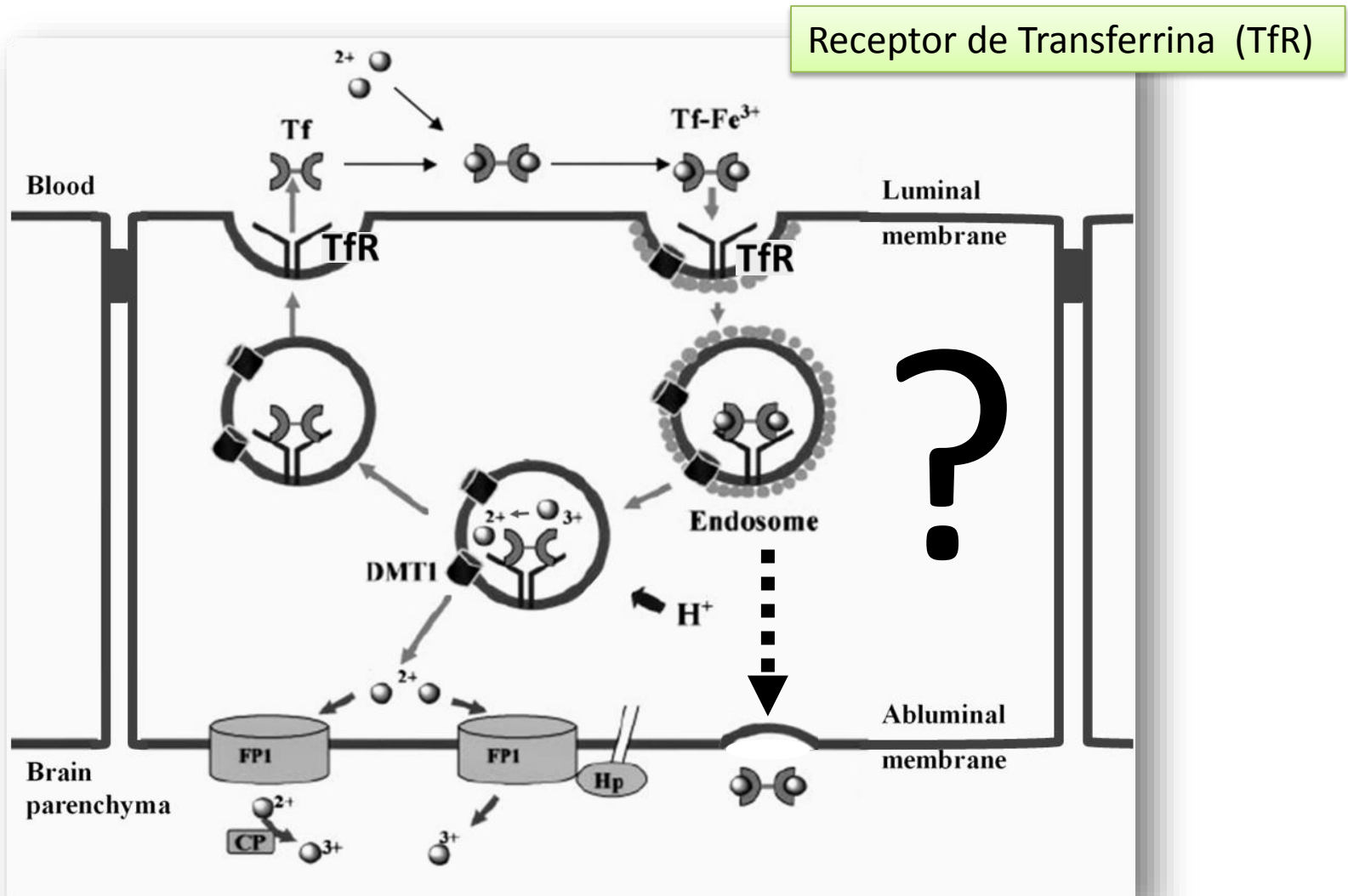
TMR



Utilizació del Transport Mediat per Receptors (TMR)



Utilització del Transport Mediat per Receptors (TMR)



Anticossos monoclonals dirigits contra el TfR



OX-26 (ratolí) → TfR de rata



Ri7-217 (rata) → TfR de ratolí



8D3 (rata) → TfR de ratolí

- Resultats contradictoris
- Mecanismes intracel·lulars desconeguts
- Tècniques indirectes de detecció

THE JOURNAL OF GENE MEDICINE
J Gene Med 2004; 6: 906-912.
Published online 30 March 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Organ-specific gene expression controlled by the opsin promoter after intravitreal gene administration in adult mice

Chunni Zhu
Yun Zhang
Yu-feng Zhang
Jian Yi Li
Ruben J. Boado
William M. Pardridge*

RESEARCH ARTICLE

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism
22:223-231 © 2002 The International Society for Cerebral Blood Flow and Metabolism
Published by Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia

Imaging Brain Amyloid of Alzheimer's Disease in Transgenic Mice With an Aβ Imaging Agent

*Department of Medicine, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California; †Department of Medicine, University of California School of Medicine, Los Angeles, CA 90024

Brain-specific expression of an Aβ imaging agent after intravitreal administration

Ningya Shi, Yun Zhang, Chunni Zhu, Ruben J. Boado, and William M. Pardridge*

Department of Medicine, University of California School of Medicine, Los Angeles, CA 90024

Communicated by M. Frederick Hawthorne, University of California, Los Angeles, CA, August 24, 2001 (received for review June 8, 2001)

Pharmaceutical Research, Vol. 24, No. 5, May 2007 (© 2007)
DOI: 10.1007/s11095-006-9224-x

Research Paper

Targeted Gene Delivery

ARTICLE

Engineering and Expression of a Chimeric Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease: Aβ Antibody for Blood-Brain Barrier Delivery in the Mouse

Ruben J. Boado,^{1,2} Yun Zhang,^{1,2} Yuntao Wang,² William M. Pardridge²

¹ArmaGen Technologies, Inc., Santa Monica, California

²Department of Medicine, UCLA, Los Angeles, California 90024; telephone: 310-825-8858;

pardridge@mednet.ucla.edu

Received 28 August 2008; revised 28 August 2008; accepted 12 September 2008

Published online 19 September 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.22135

OBJECTIUS GENERALS

- Estudiar la viabilitat de l'anticòs 8D3, dirigit contra el receptor de transferrina, com a cavall de Troia molecular per transportar substàncies a través de la barrera hematoencefàlica en ratolins.
- Estudiar els mecanismes fisiològics, cel·lulars i intracel·lulars mitjançant els quals el 8D3 i/o el seu cargo es podien transportar a través de la barrera hematoencefàlica.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

1. Confirmar, per microscòpia de fluorescència, la reactivitat de l'anticòs 8D3 per al TfR, present en les cèl·lules endotelials dels capilars cerebrals, després de l'administració *in vivo*.
2. Estudiar, mitjançant microscòpia de fluorescència, la capacitat transcitòtica del 8D3 després de l'administració *in vivo*.
3. Desenvolupar un immunocomplex (IC) format per l'anticòs 8D3 (vector molecular) i fragments Fab' (càrrega o cargo a transportar).
4. Estudiar, mitjançant microscòpia de fluorescència, la localització, colocalització i estabilitat dels components de l'IC després de la seva administració i.v. i a diferents temps de recirculació.
5. Desenvolupar un IC format per l'anticòs 8D3 (vector molecular) i nanopartícules d'or (AuNPs, càrrega simulada que es transporta) i realitzar un estudi a nivell de microscòpia electrònica.
6. Estudiar, mitjançant microscòpia electrònica de transmissió, la localització subcel·lular del conjugat 8D3-AuNP a la barrera hematoencefàlica després de la seva administració i.v. i a diferents temps de recirculació.
7. Estudiar tridimensionalment la localització subcel·lular del conjugat 8D3-AuNP a la BHE després de la seva administració i.v. aplicant la tècnica de microscòpia d'escaneig electrònic (SBF-SEM).
8. Establir i caracteritzar una internalització endocítica dependent del temps i un patró de processament endosomal del conjugat 8D3-AuNP a la barrera hematoencefàlica.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps



Study of the transcytosis of an anti-transferrin receptor antibody with a Fab' cargo across the blood–brain barrier in mice



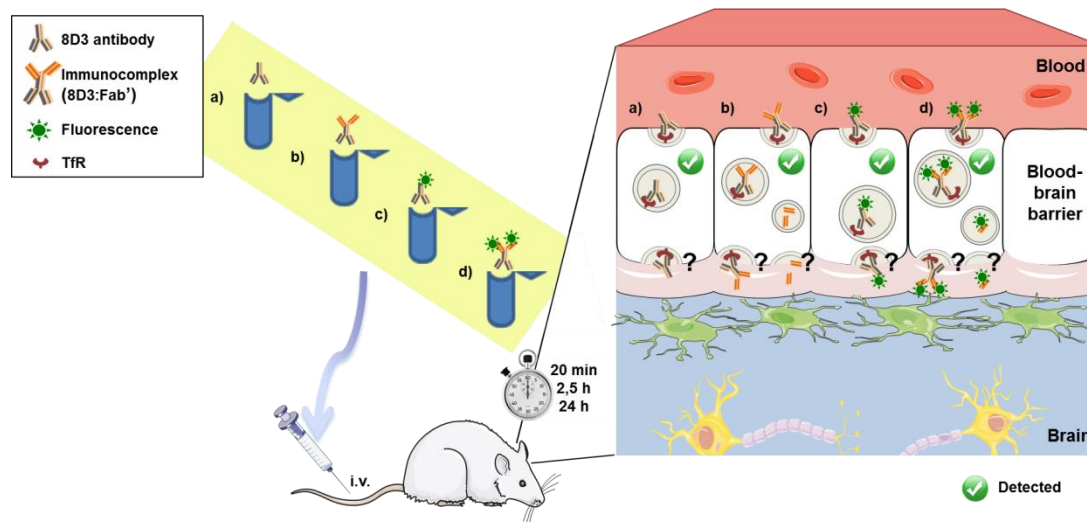
Gemma Manich^a, Itsaso Cabezón^a, Jaume del Valle^{a,d}, Joaquim Duran-Vilaregut^{a,d}, Antoni Camins^{b,c}, Mercè Pallàs^{b,c}, Carme Pelegrí^{a,d,1}, Jordi Vilaplana^{a,d,*,1}

^a Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

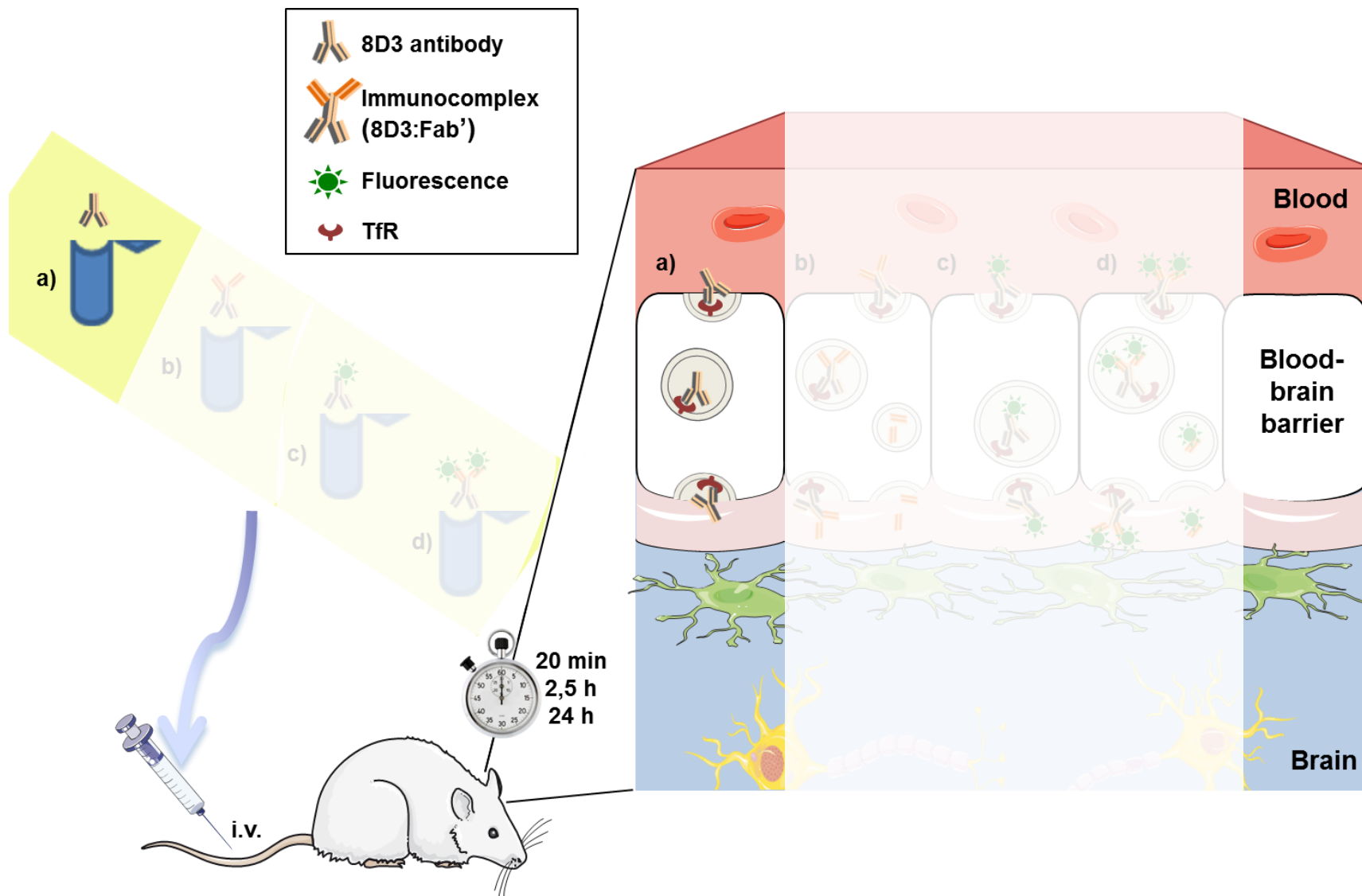
^b Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

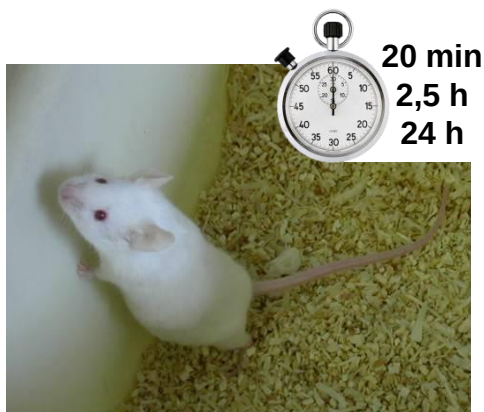
^d CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain



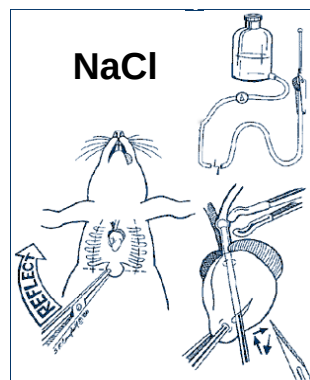
Disseny experimental



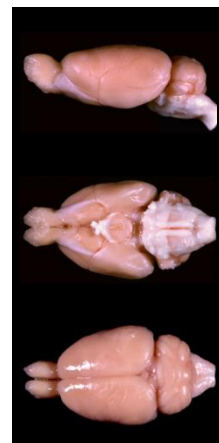
Material i mètodes



ICR-CD1, 7-9 setmanes

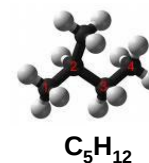


Perfusió

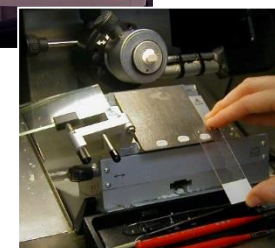


Extracció

Isopentà
- 80°C



Congelació

Talls
criostàticsFixació amb
acetona

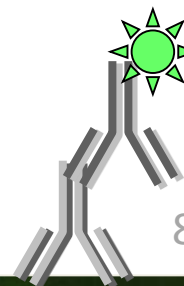
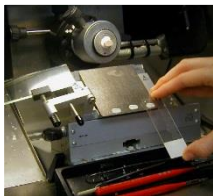
1:50 Transferr 488	1:100 Transferr 488	PBS 488	127.2 ICR CINa 3m
1:200 Transferr 488	1:100 Transferr 488	PBS PBS	128.1 ICR CINa 3m

Immunofluorescència

Obtenció
d'imatgesAnàlisi
d'imatges

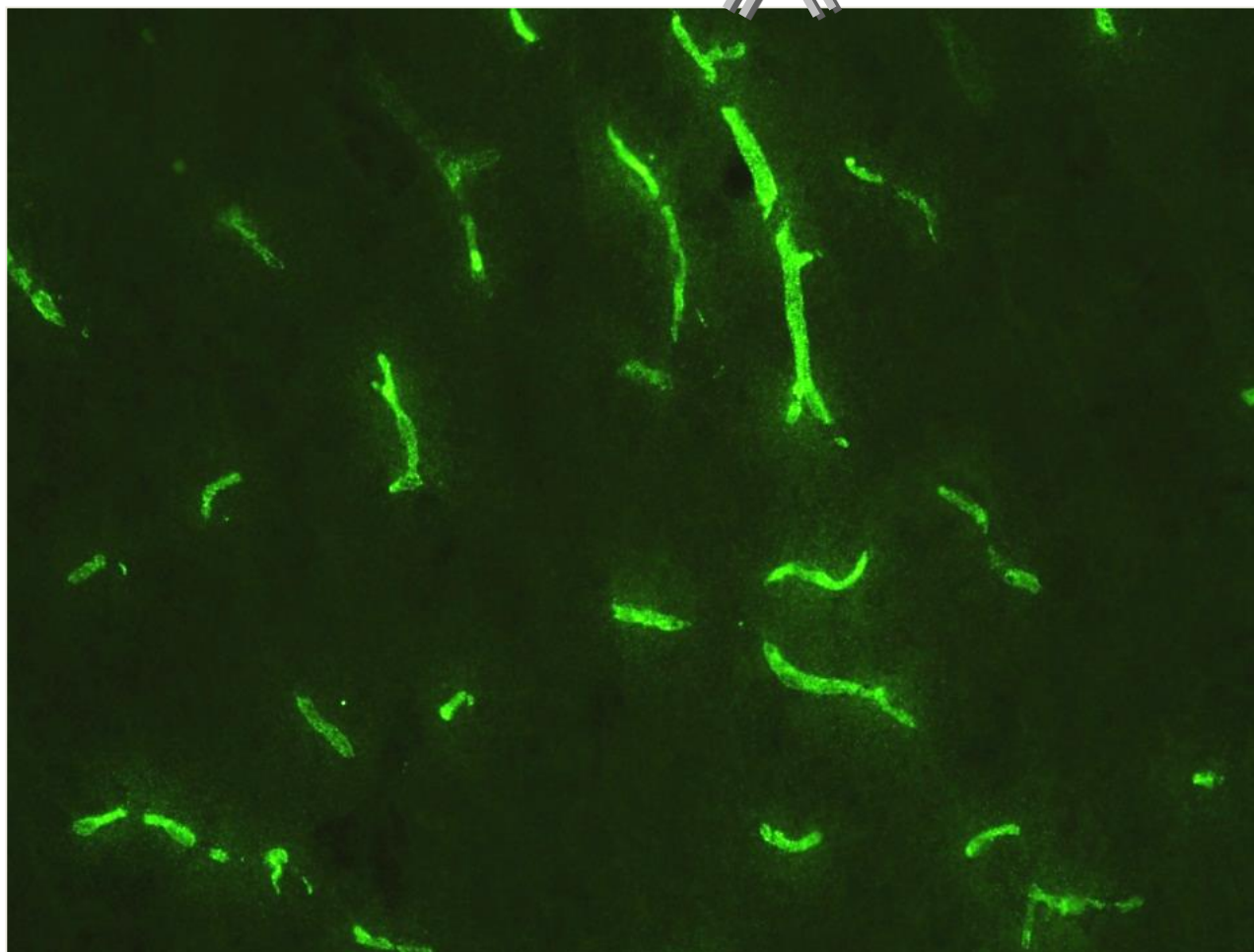
**a) Estudar capacitat transcitòtica
del 8D3 després d'administració i.v**

 **8D3 antibody**
300µL; 1mg/mL



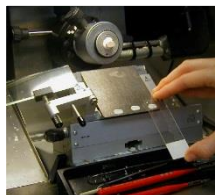
AF488 α-IgG rata

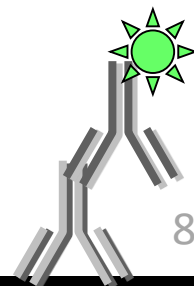
8D3 (i.v.)

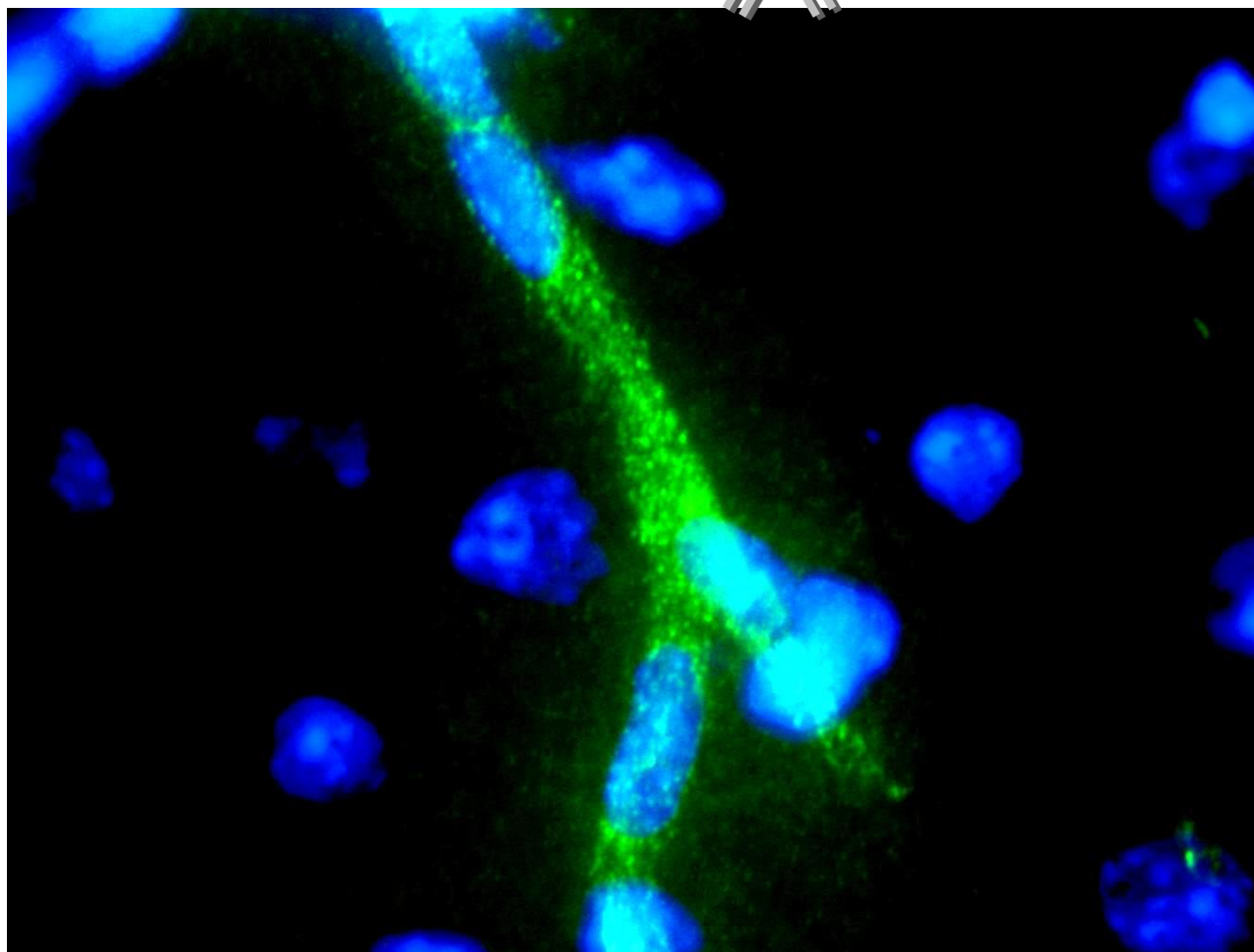


Estudiar capacitat transcitòtica del
8D3 després d'administració i.v

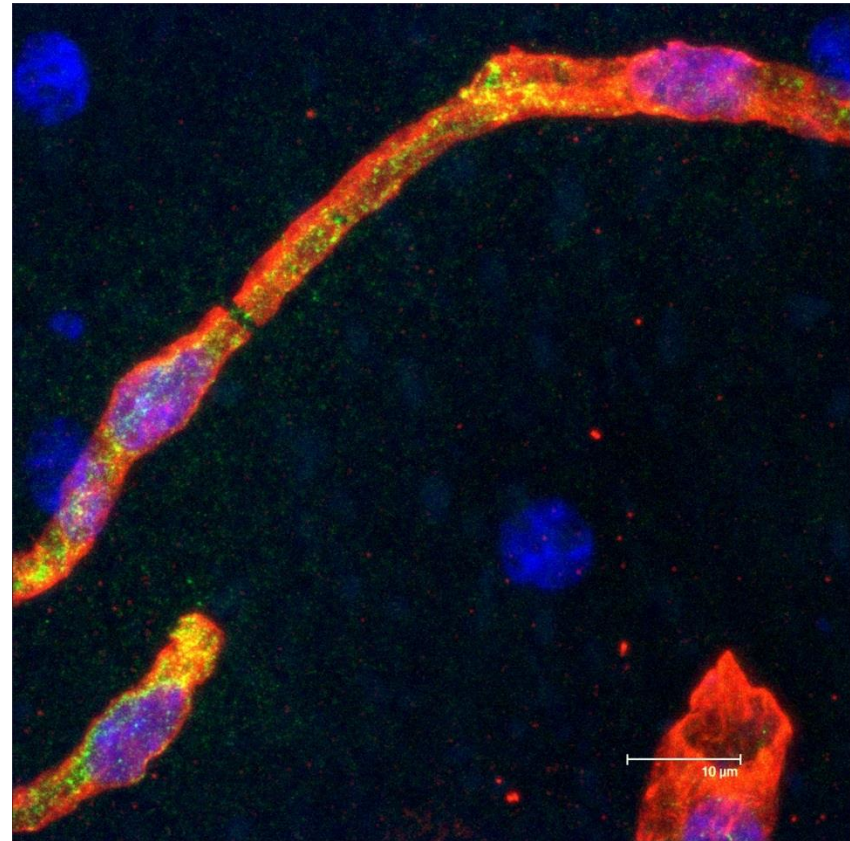
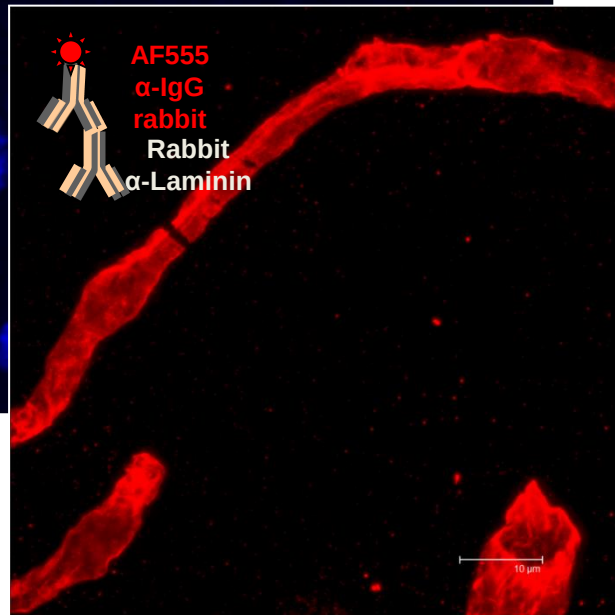
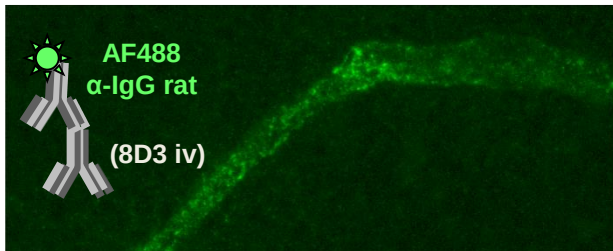
 8D3 antibody
300µL; 1mg/mL



 AF488 α-IgG rata
8D3 (i.v.)



Estudiar capacitat transcitòtica del 8D3 després d'administració i.v



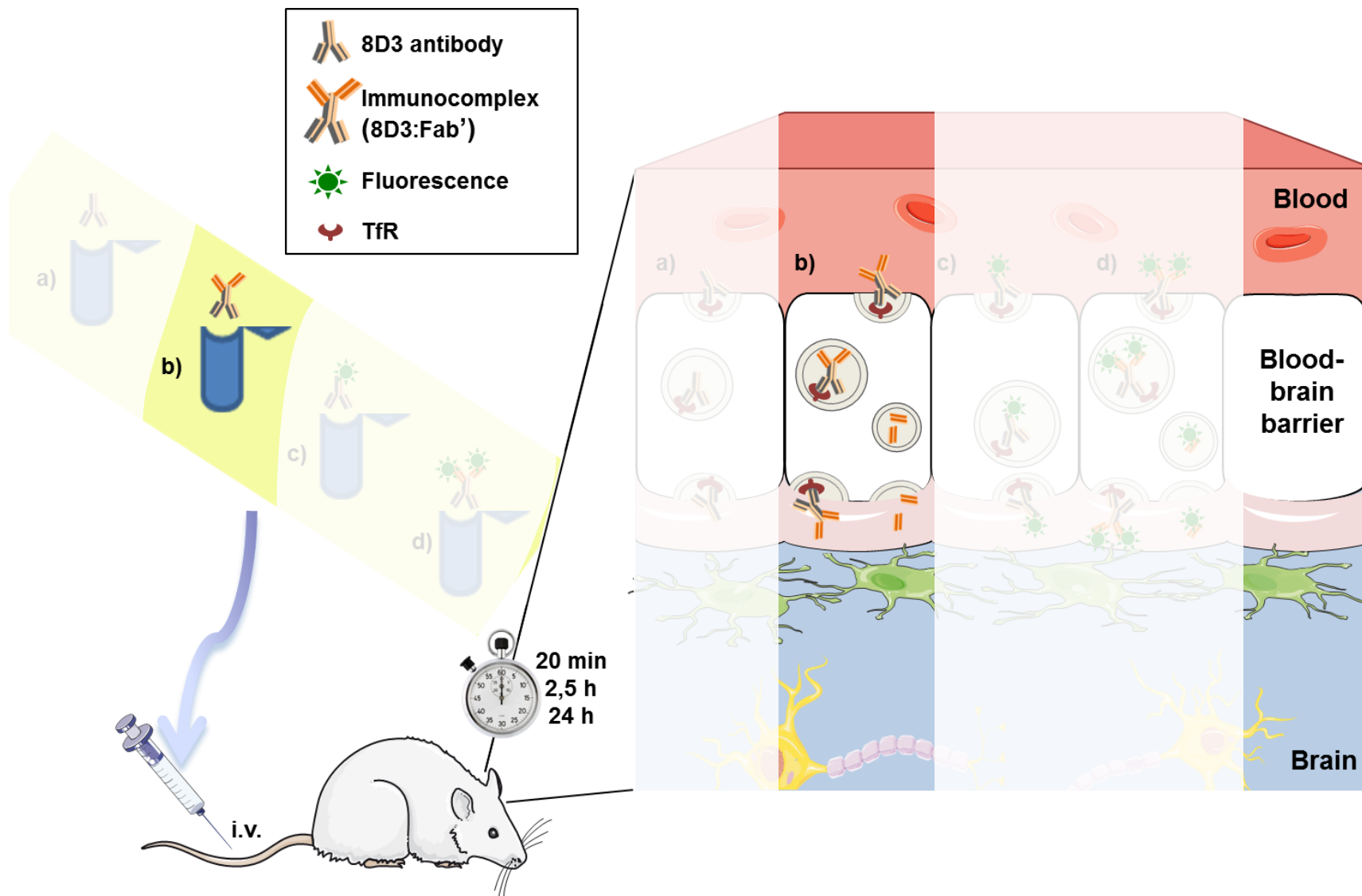
→ Microscopi
confocal

1 Modelización 3D sm

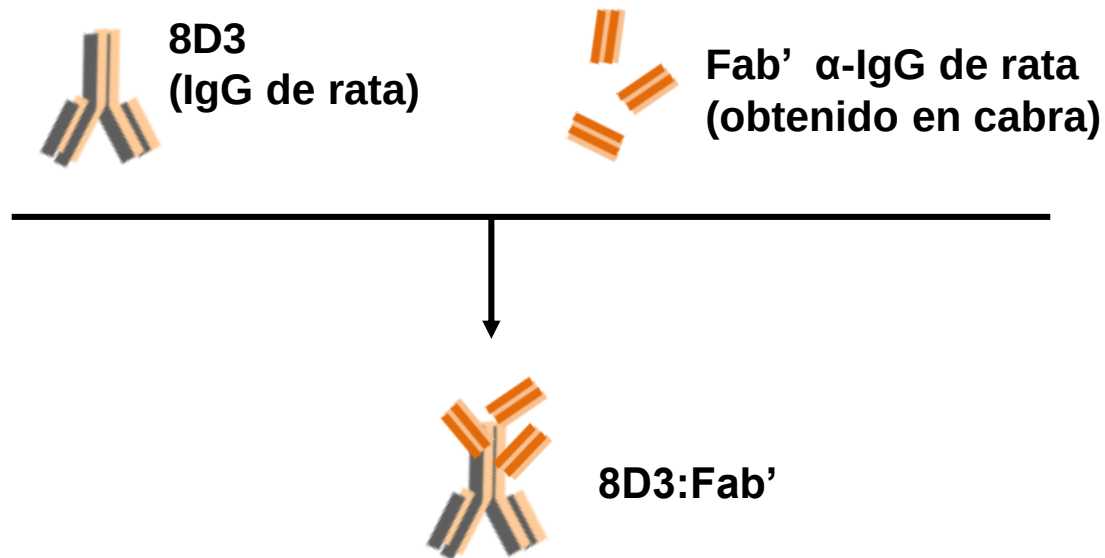
2 Modelización 3D r

3 Modelización 3D n

Disseny experimental

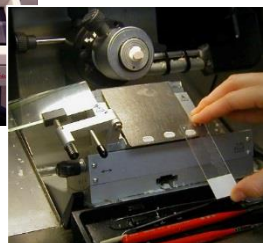
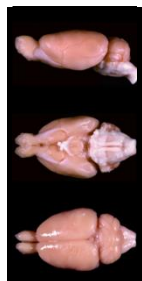
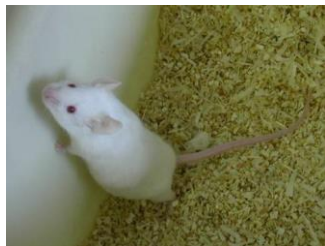


Desenvolupar un immunocomplex (8D3-Fab') per veure la capacitat del 8D3 per transportar substàncies a través de la BHE.



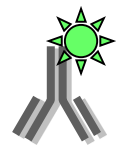


Formació de 8D3-Fab': determinació de la ratio

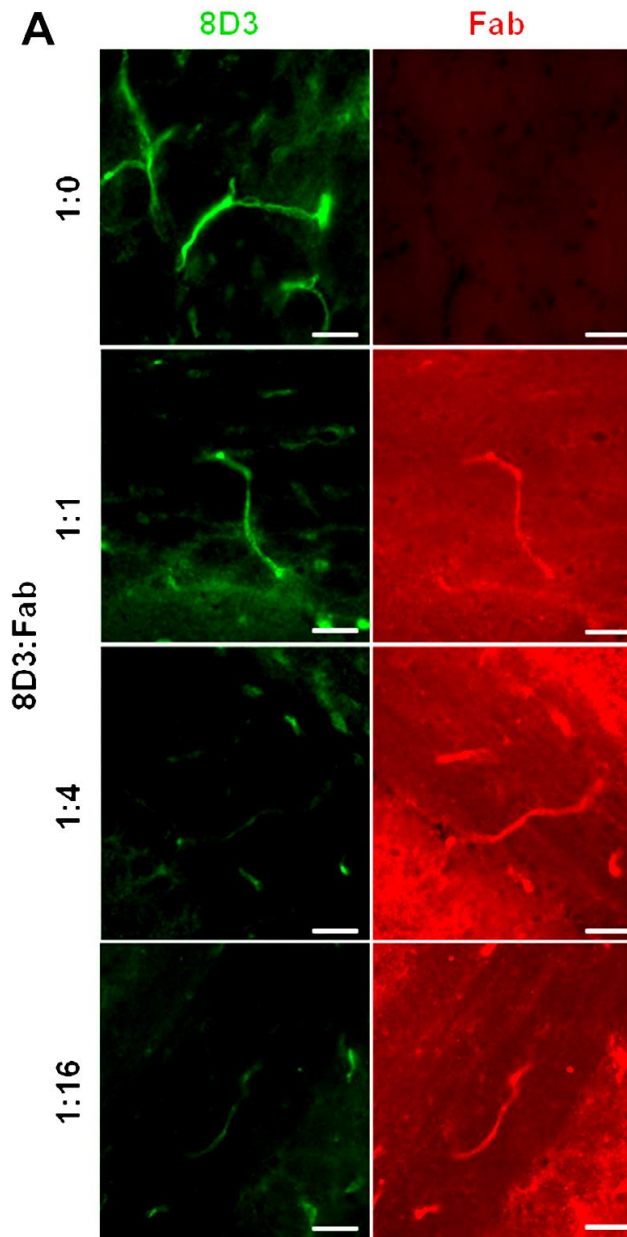
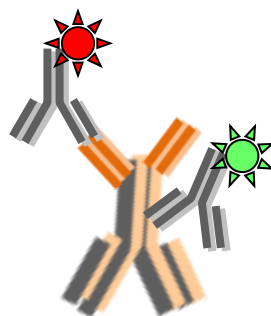


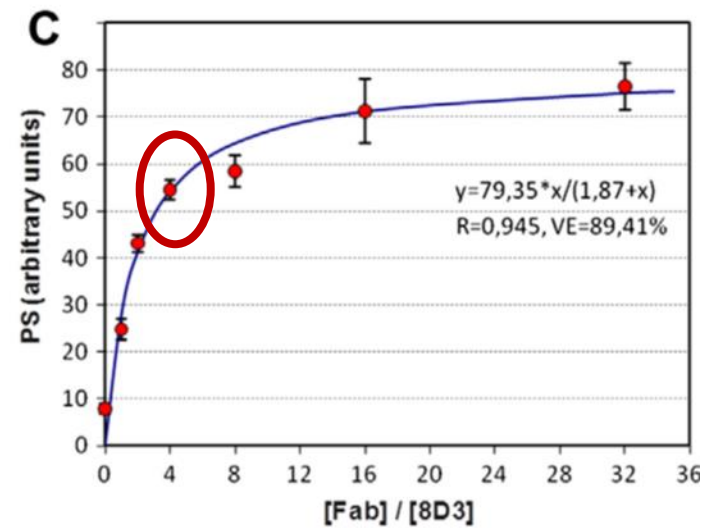
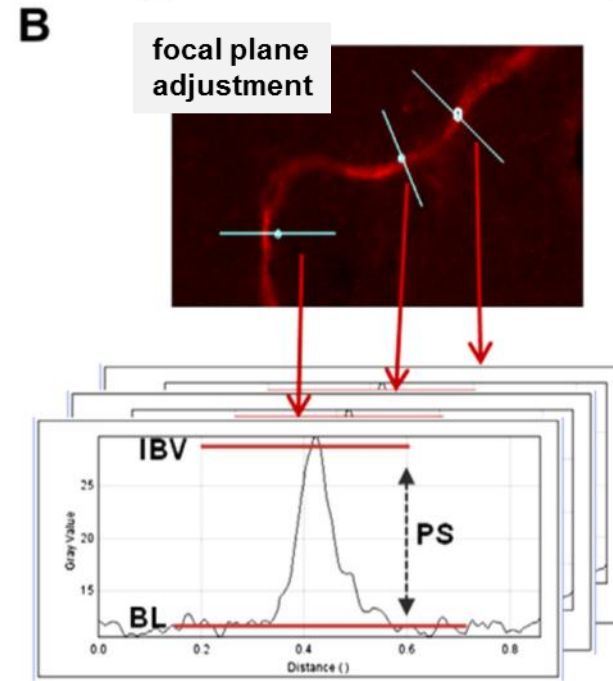
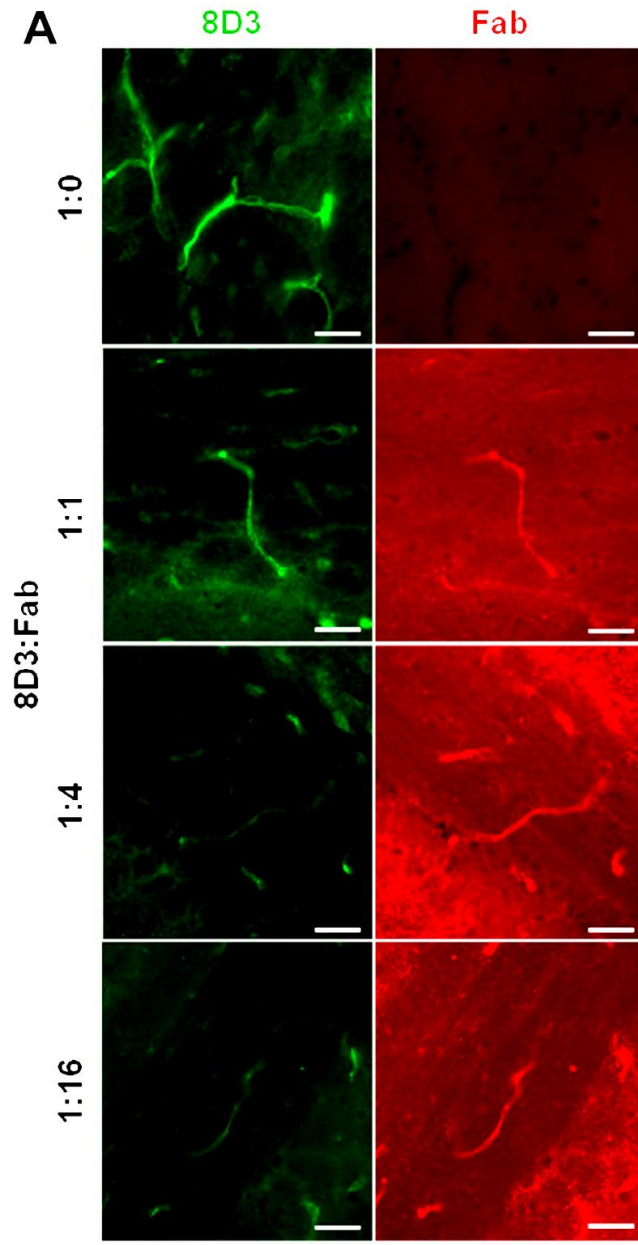

	:	
8D3	:	Fab'
1	:	0
1	:	1
1	:	2
1	:	4
....	:	
1	:	32

primera incubació

		
AF488 α-IgG de rata		AF555 α-Fab de cabra

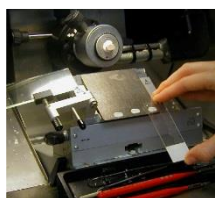
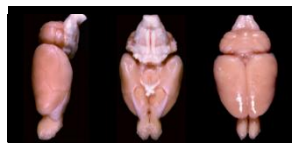
segunda incubació





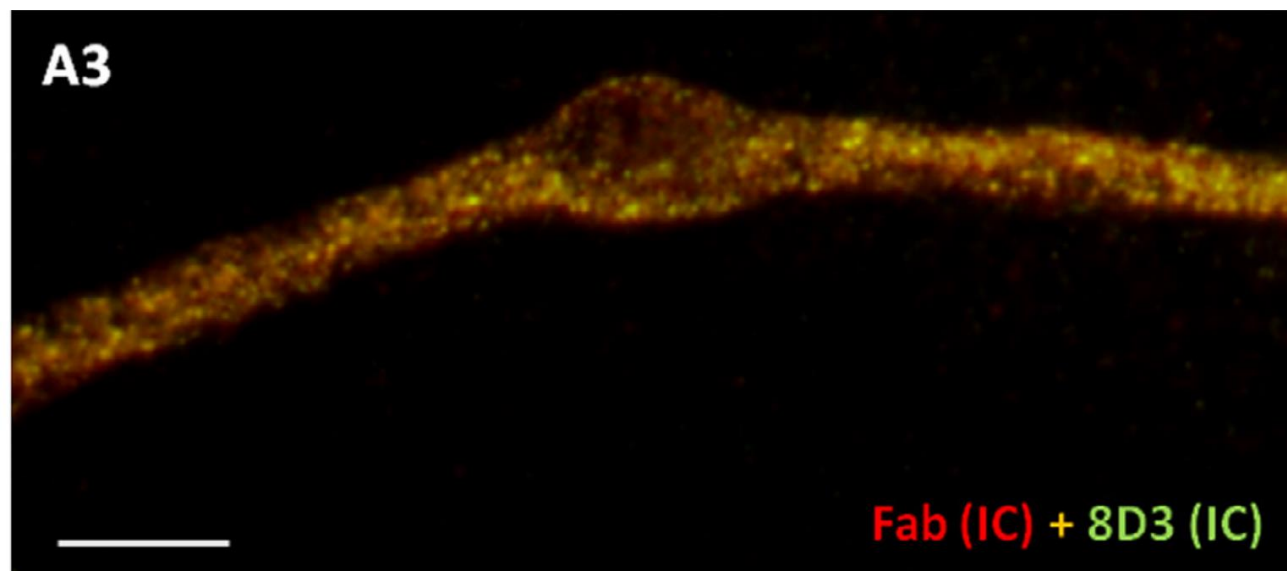
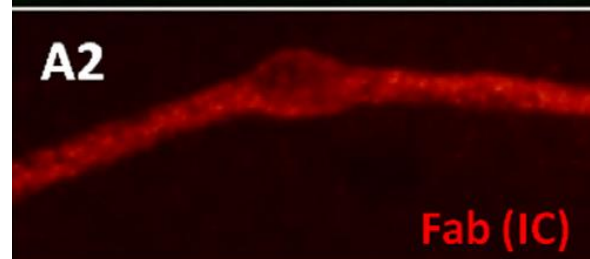
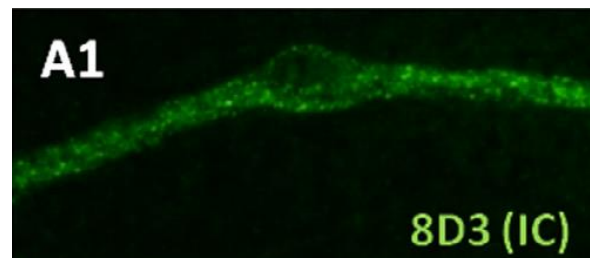
Administració intravenosa de 8D3:Fab'

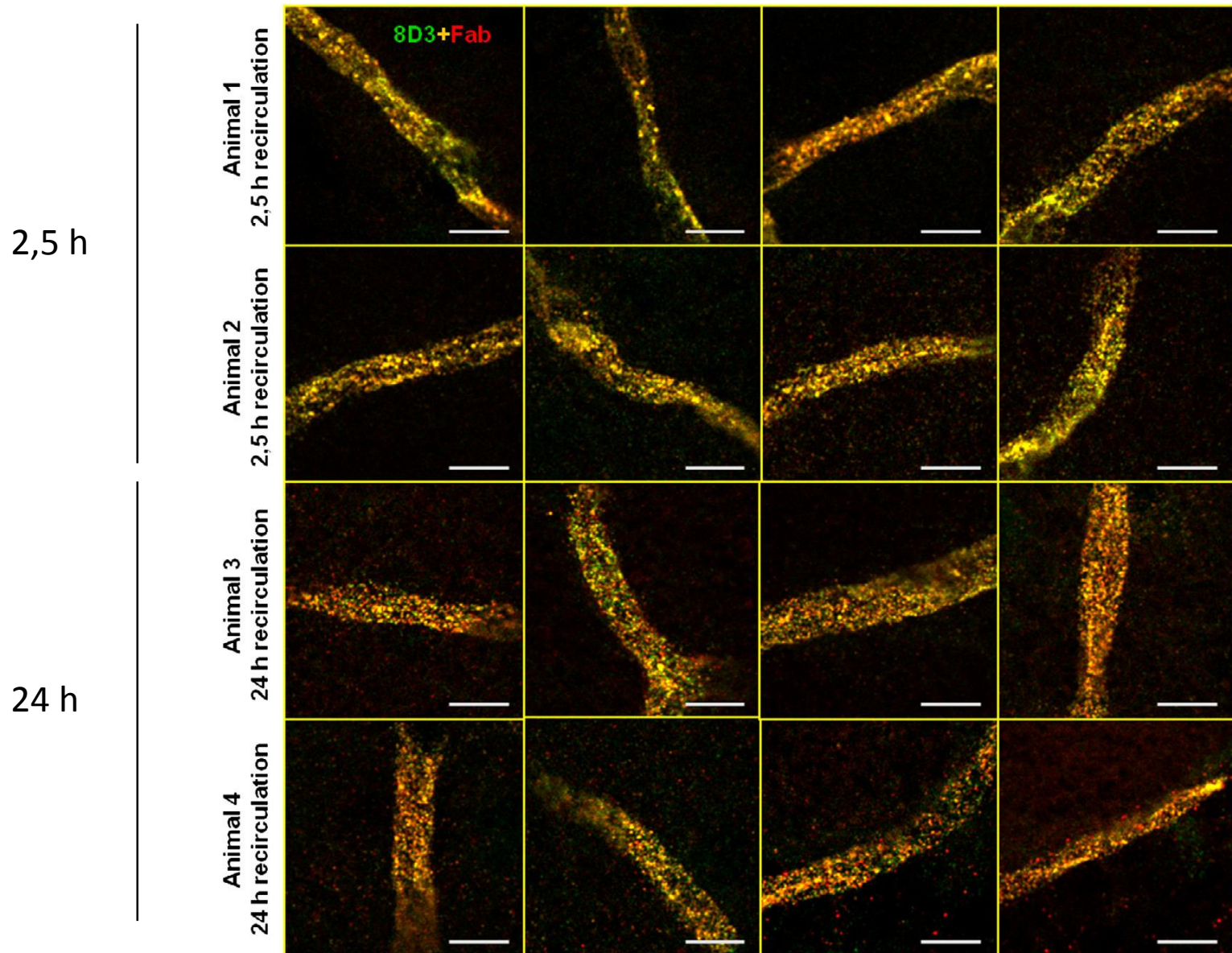
 **8D3:Fab' 1:4**
300µL; 1mg 8D3 / mL



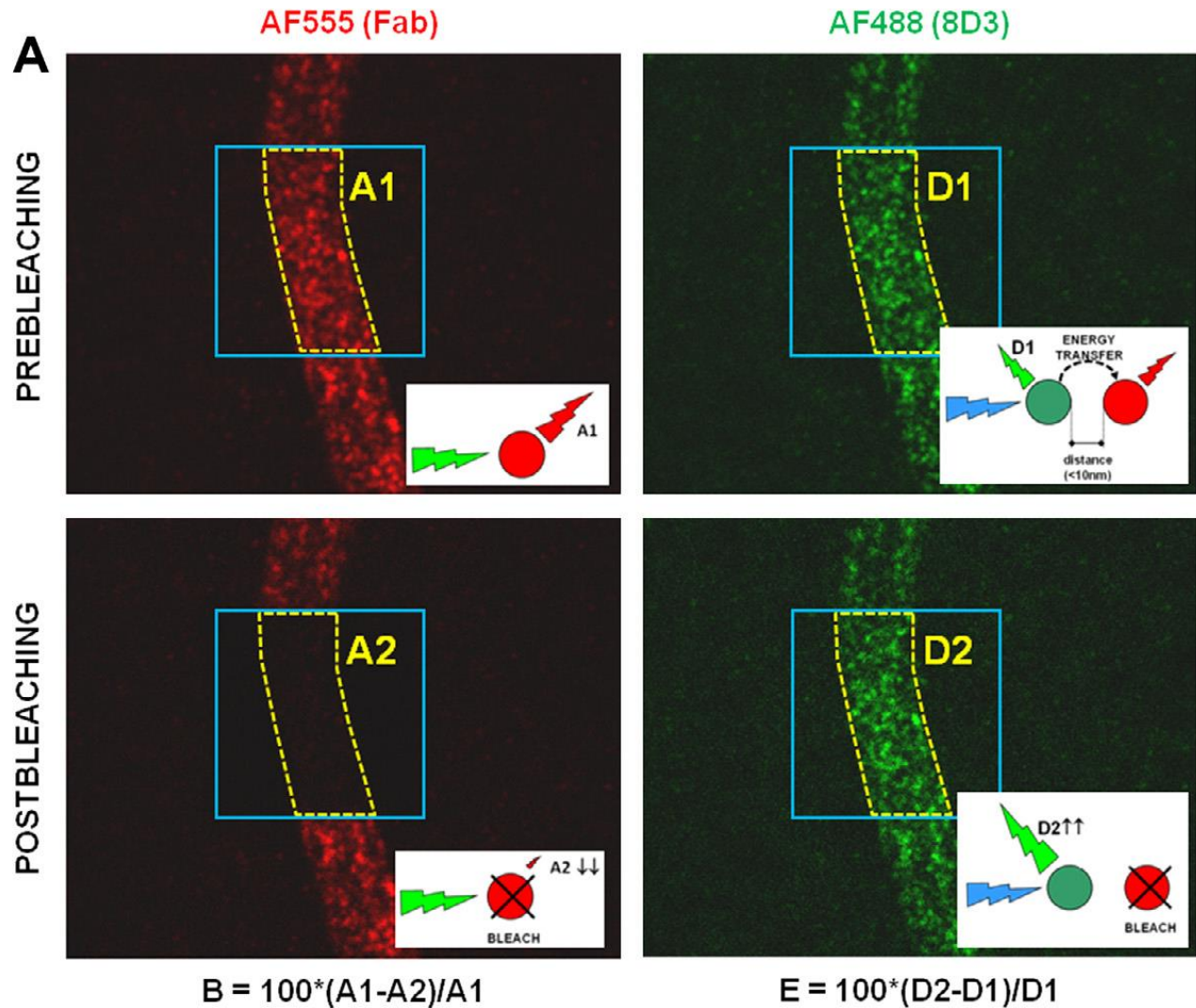
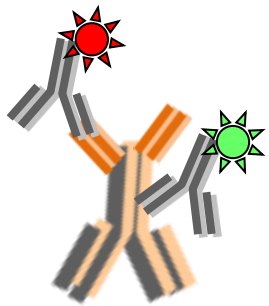

AF488
α-IgG rata

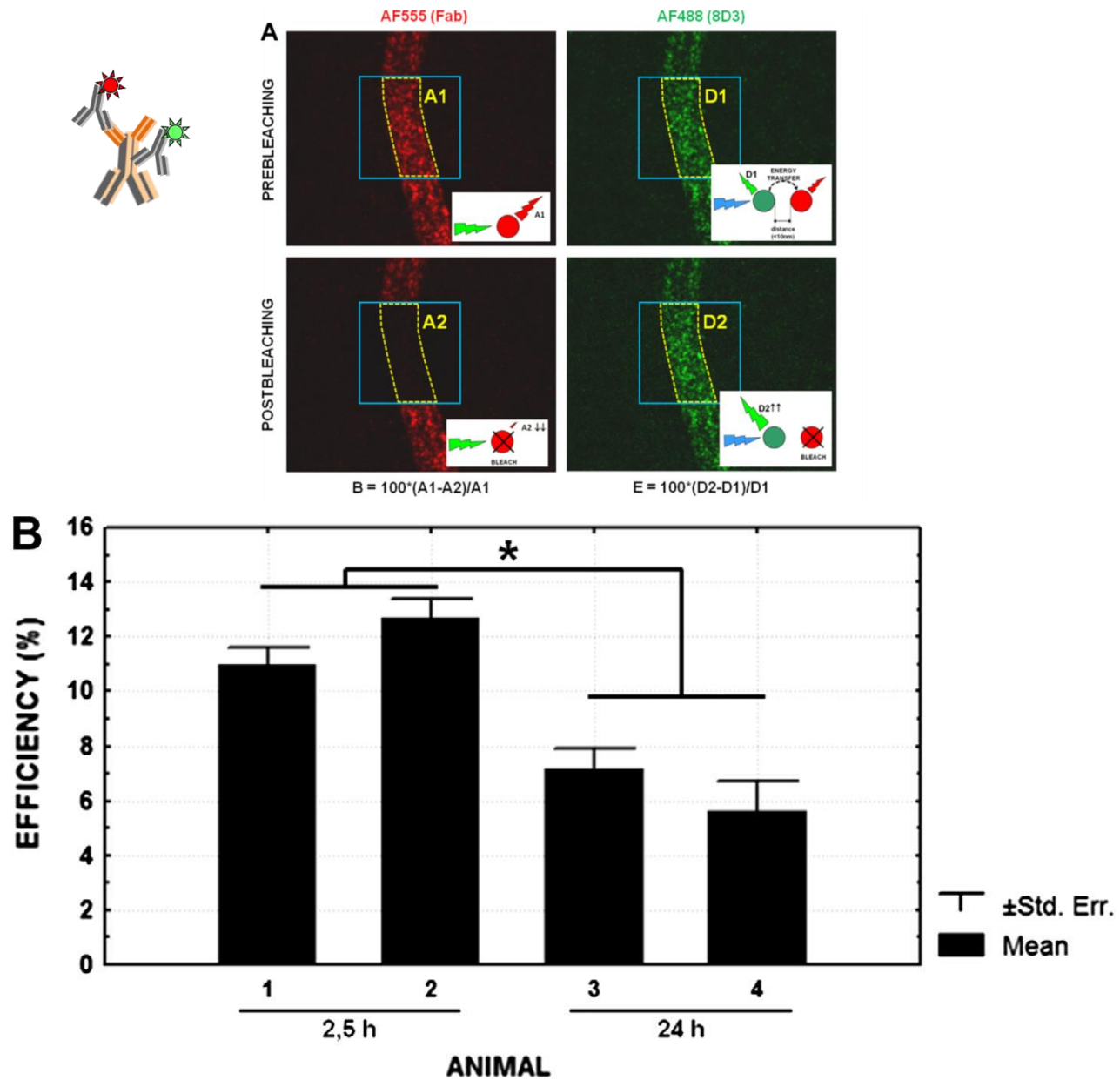

AF555
α-Fab



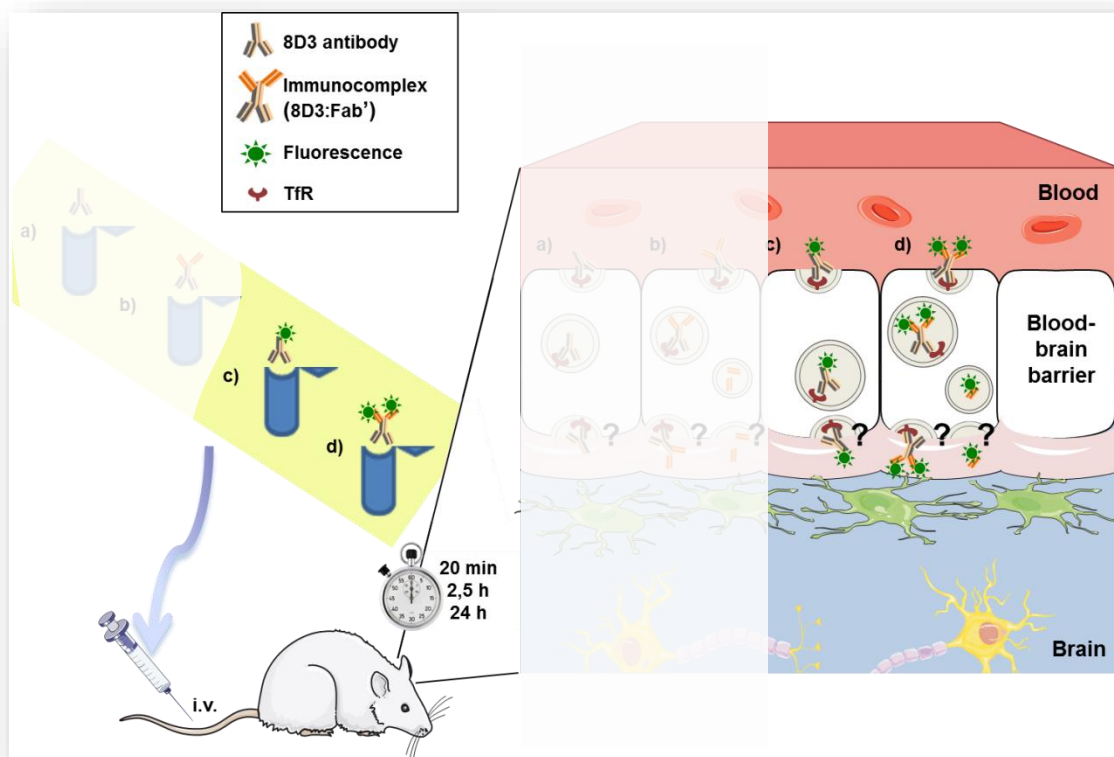


Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) technique





Administració intravenosa de 8D3^{FITC} i 8D3-Fab^{FITC}



c) Formación de 8D3^{FITC}

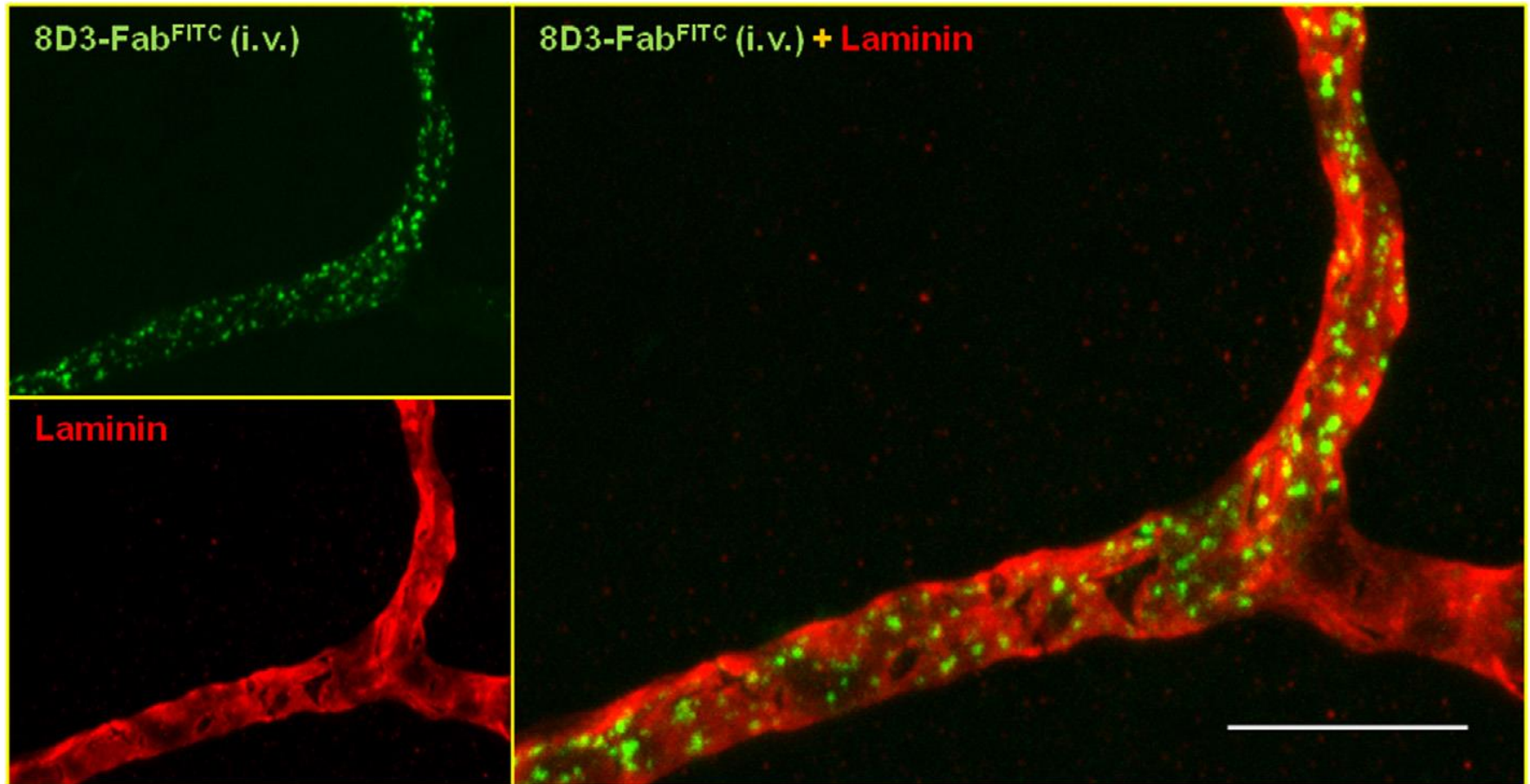


LYNX Rapid Fluorescein
Antibody Conjugation Kit®

d) Formación del 8D3-Fab^{FITC}



8D3 : Fab^{FITC} 1: 4

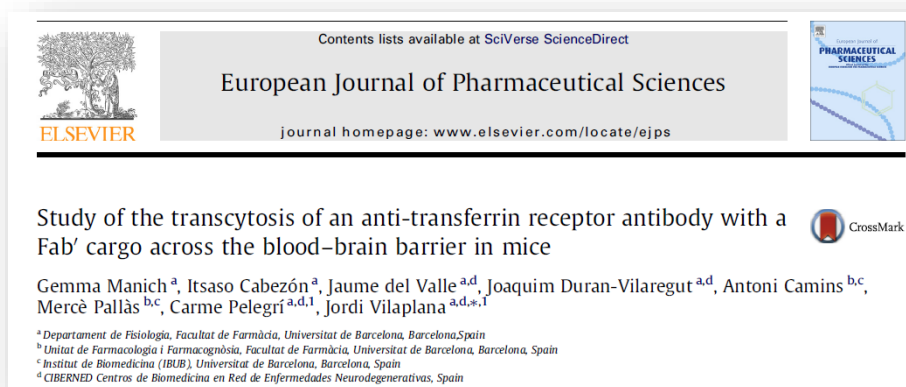
Administració intravenosa de 8D3:Fab^{FITC}

Conclusions

L'anticòs 8D3 administrat i.v., sol o amb càrrega afegida, és capaç d'unir-se al TfR i quedar retingut a les cèl·lules endotelials.

La disminució de la col·localització entre el 8D3 i els fragments Fab' que s'observa al llarg del temps suggereix algun tipus de processament de l'immunocomplex (IC) dins de les cèl·lules endotelials.

Ni el 8D3 ni l'IC assoleixen de forma significativa el parènquima cerebral.



Trafficking of Gold Nanoparticles Coated with the 8D3 Anti-Transferrin Receptor Antibody at the Mouse Blood–Brain Barrier

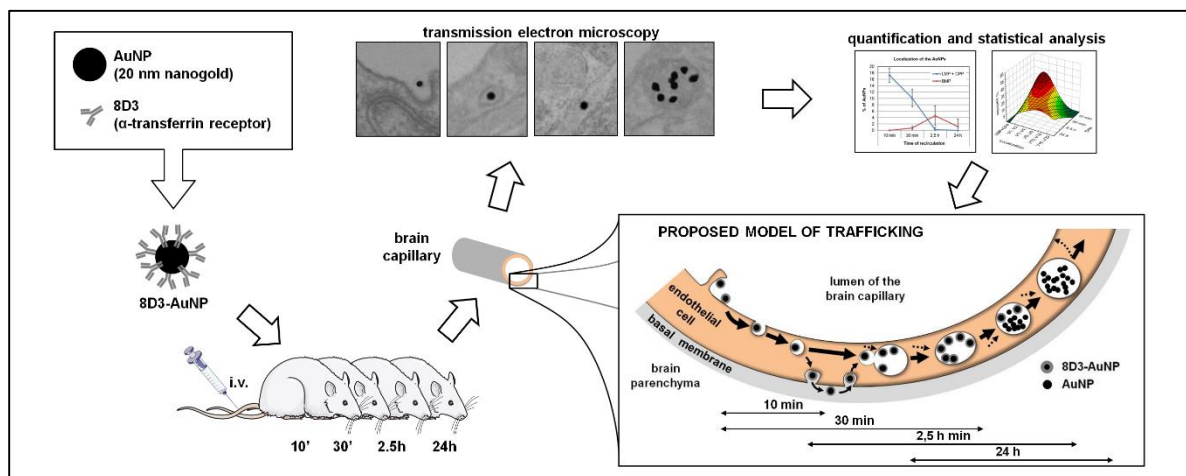
Itsaso Cabezón,^{†,‡} Gemma Manich,[†] Raquel Martín-Venegas,[†] Antoni Camins,^{‡,§,||} Carme Pelegrí,^{†,||,⊥} and Jordi Vilaplana^{*,†,||,⊥}

[†]Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

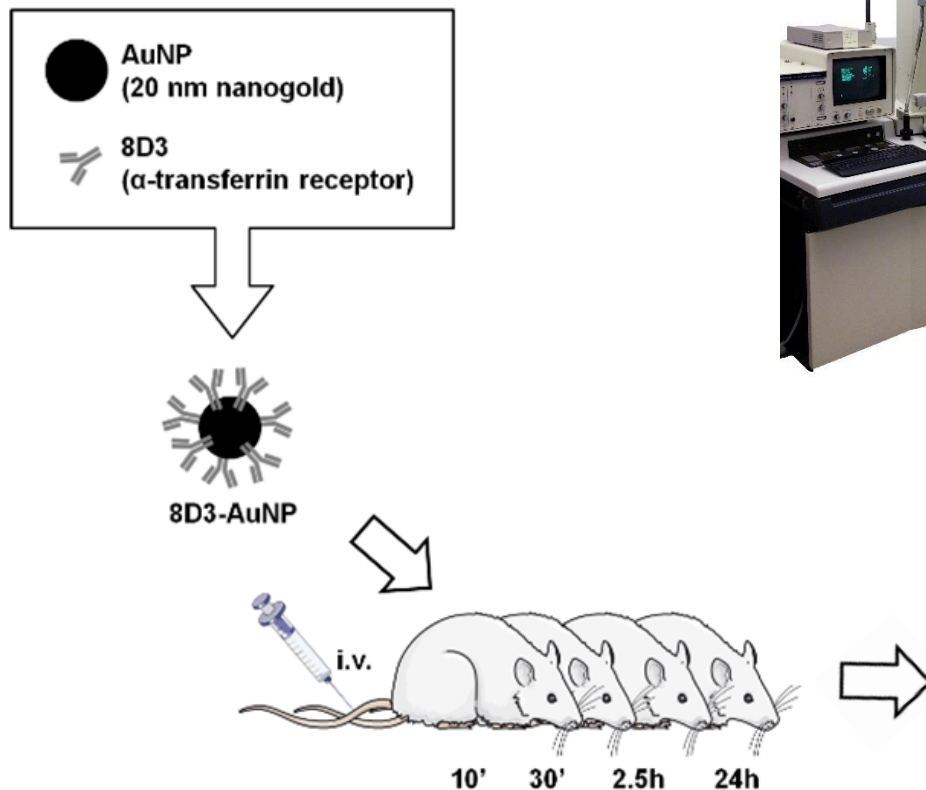
[‡]Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

[§]Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

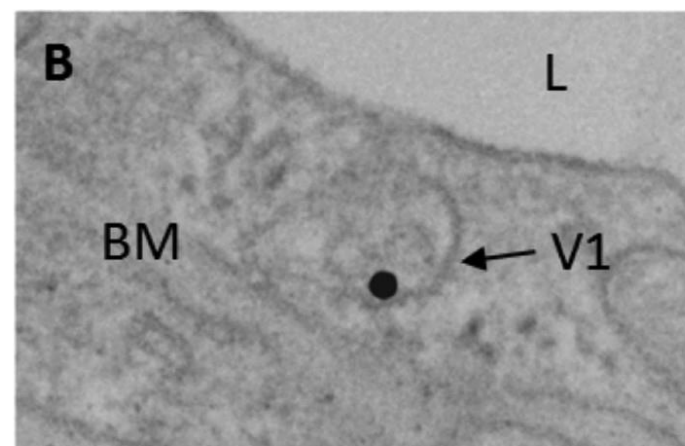
^{||}CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, 28031 Madrid, Spain



Disseny experimental



Transmission Electron Microscopy (TEM)



Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB), Barcelona, Spain

Material i mètodes

Formation of the 8D3-AuNP conjugates: *InnovaCoat GOLD Covalent Conjugation Kit*.



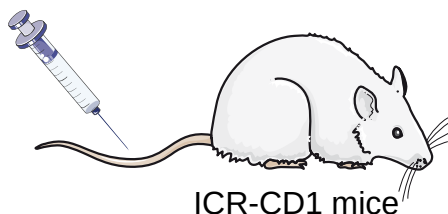
8D3:AuNP ratio: 30:1



Control conjugates: IgG-AuNP

Administració intravenosa

300 µl 8D3-AuNP
428,57 µg 8D3/ml



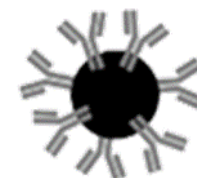
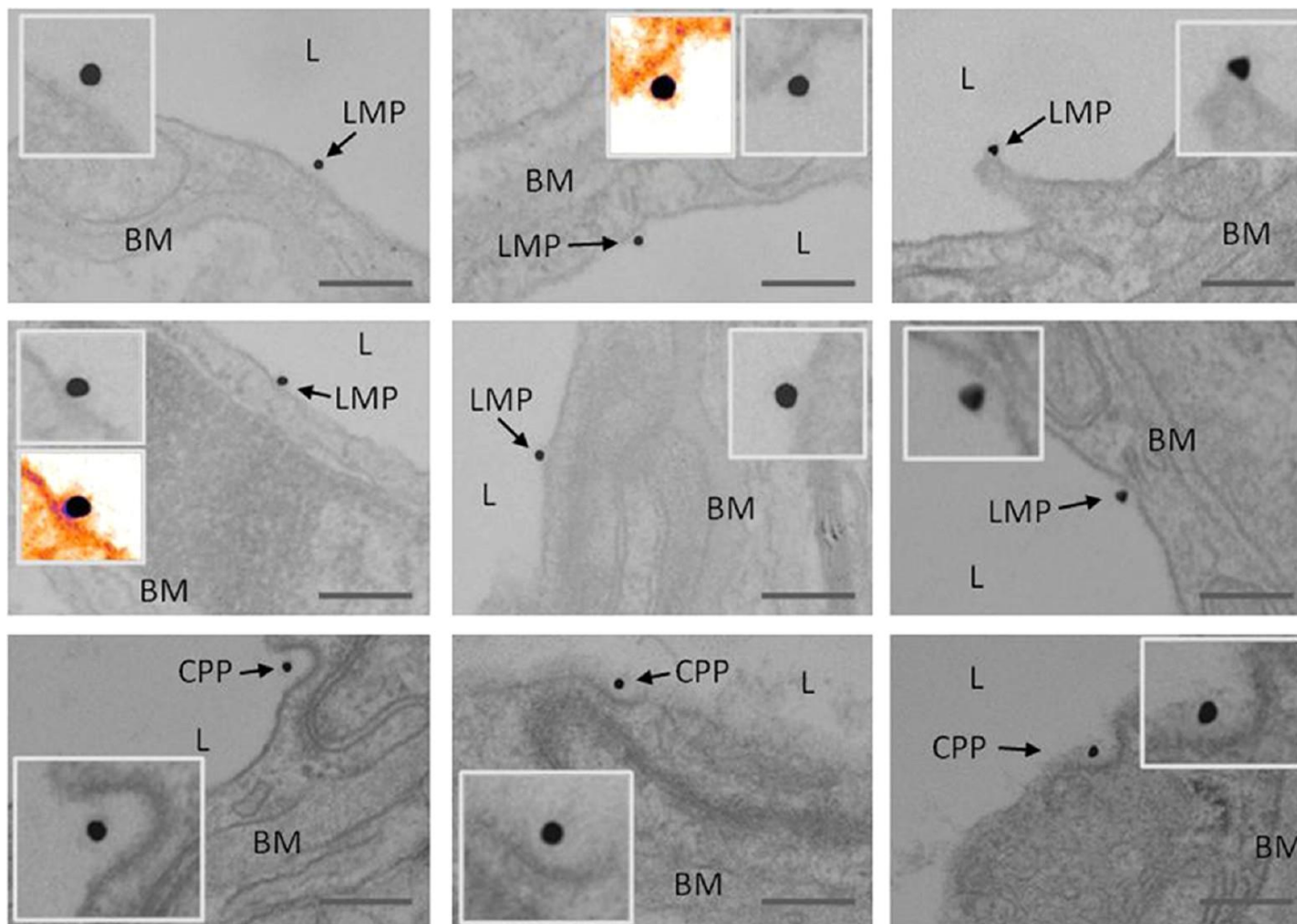
10 min
30 min
2,5 h
24 h

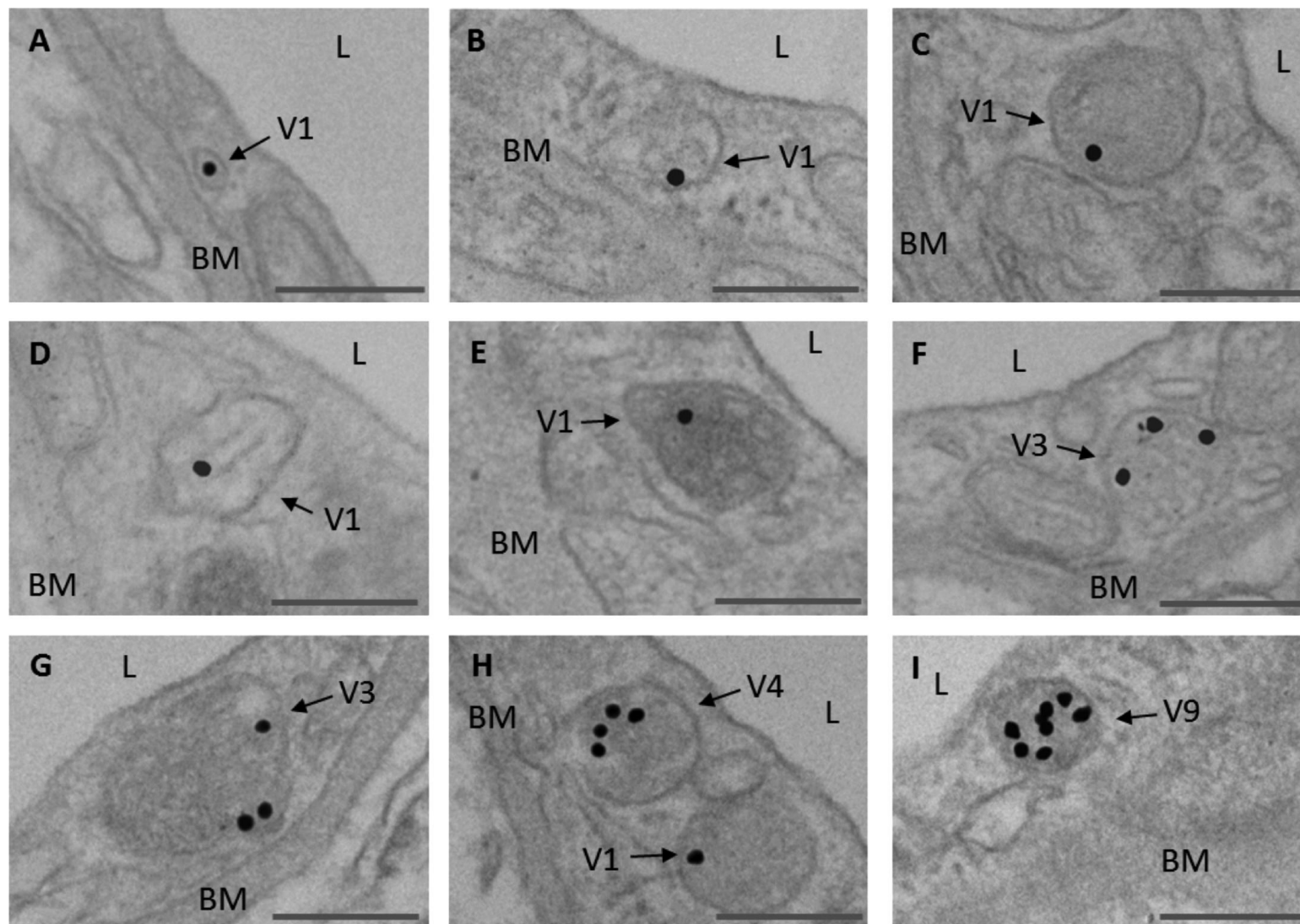
- Intracardially perfused with p-formaldehyde at 4% and glutaraldehyde at 0.1%
- Brains were then removed
- Vibratome
- post-fixed
- 2% osmium tetroxide containing 0.8% potassium ferrocyanide,
- Embedded in Epon resin.
- Semi-thin sections (1 µm thickness)
- Methylene blue staining to localize regions of interest
- Ultrathin sections (5-70 nm thickness) Leica Ultracut UC6 ultramicrotome
- 200 mesh copper grids
- Post-stained with uranyl acetate and lead citrate
- JEM-1010 transmission electron microscope
- Bioscan 792 camera obtain the images
- Image J (National Institute of Health, USA)
- STATISTICA for Windows (StatSoft Inc.)

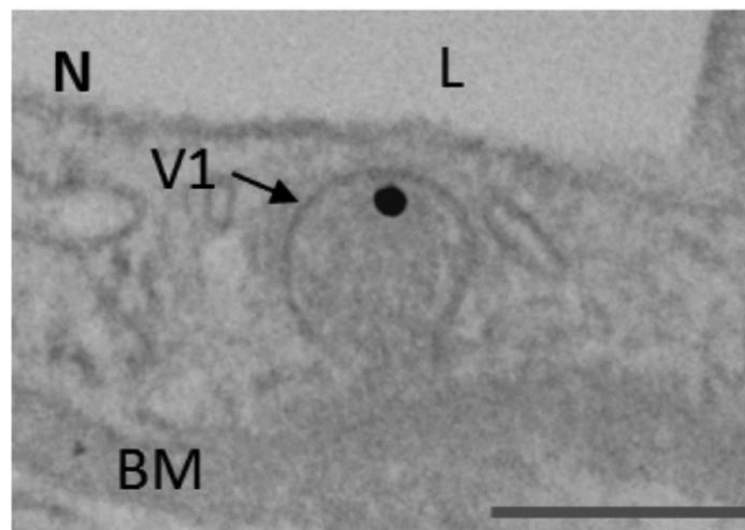
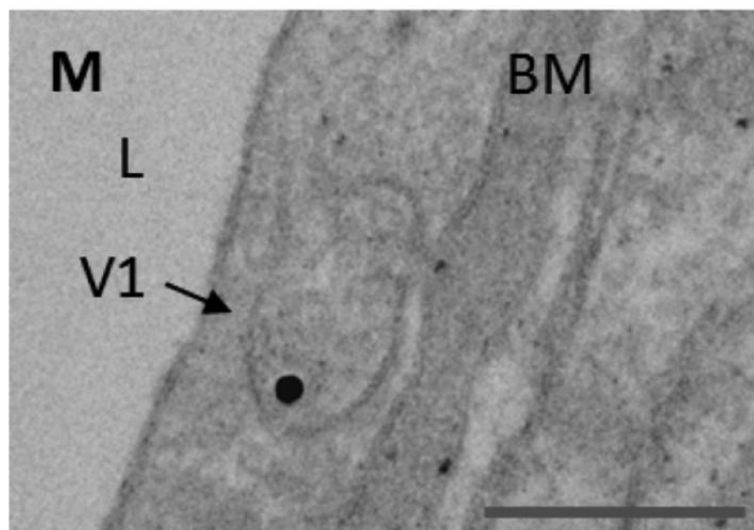
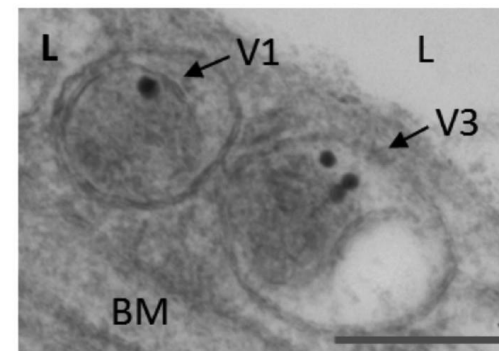
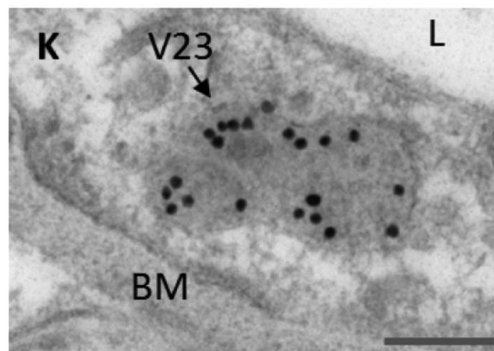
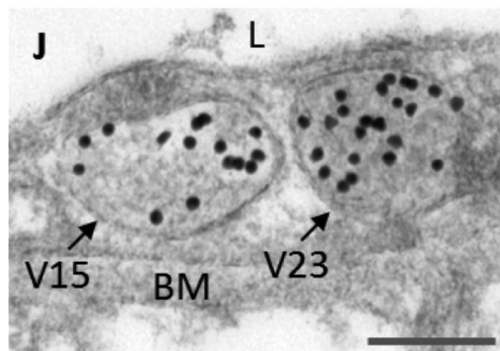


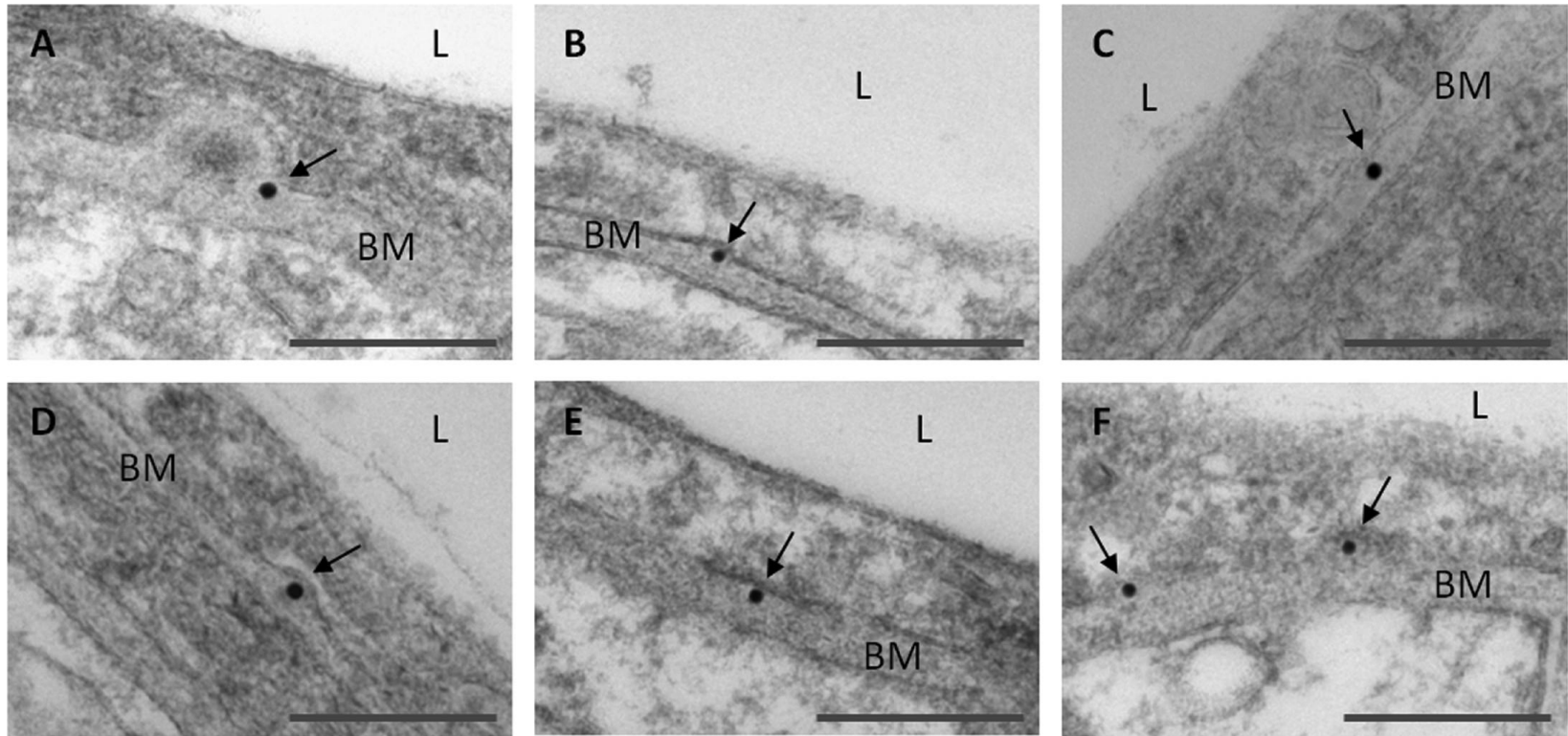
Patrons de localització de les AuNPs

Luminal membrane particles (LMP)
Coated pit particles (CPP)



Patrons de localització de les AuNPs**AuNPs en vesícules (V_i ; $i = \# \text{ AuNP}$)**

Patrons de localització de les AuNPs**AuNPs en vesícules (V_i ; $i = \# \text{ AuNP}$)**

Patrons de localització de les AuNPs**Basal membrane particles (BMP)****Transcitosis**

Quantificació de partícules en funció de la localització i el temps de recirculació

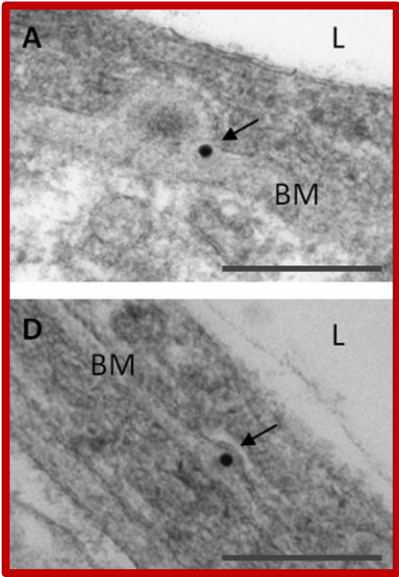
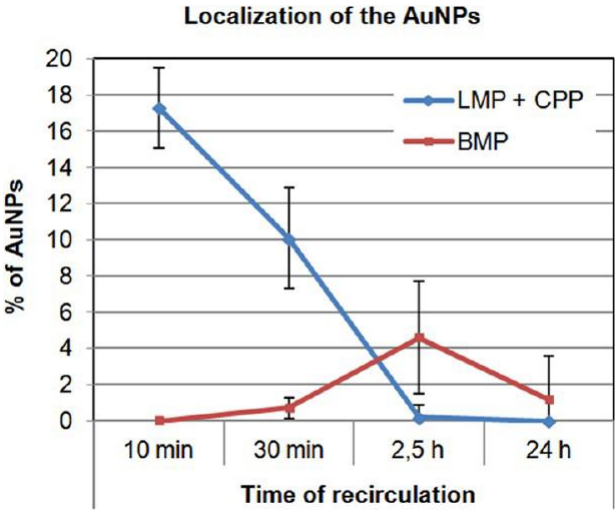
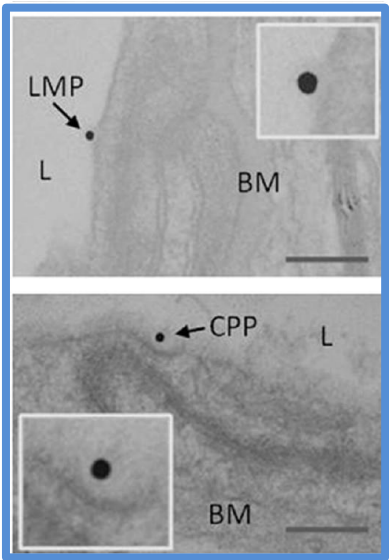
Table 1. Distribution of the Observed AuNPs, Depending on the Location and the Time of Circulation^a

	no. (percentage) of AuNPs in each localization							
	10 min		30 min		2.5 h		24 h	
LMP	12	(12.2)	11	(7.4)	1	(0.2)	0	(0)
CPP	5	(5.1)	4	(2.7)	0	(0)	0	(0)
V1	42	(42.9)	50	(33.5)	82	(20.1)	19	(11.6)
V2	14	(14.3)	14	(9.4)	26	(6.3)	14	(8.6)
V3	21	(21.4)	24	(16.1)	30	(7.3)	15	(9.2)
V4	4	(4.1)	12	(8.1)	36	(8.8)	8	(4.9)
V5	0	(0)	10	(6.7)	30	(7.3)	0	(0)
V6	0	(0)	6	(4)	0	(0)	6	(3.7)
V7	0	(0)	0	(0)	21	(5.1)	7	(4.3)
V8	0	(0)	8	(5.4)	16	(3.9)	0	(0)
V9	0	(0)	9	(6)	54	(13.2)	27	(16.6)
V10	0	(0)	0	(0)	0	(0)	20	(12.3)
V11	0	(0)	0	(0)	11	(2.7)	22	(13.5)
V12	0	(0)	0	(0)	12	(2.9)	0	(0)
V13	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
V14	0	(0)	0	(0)	14	(3.4)	0	(0)
V15	0	(0)	0	(0)	15	(3.7)	0	(0)
V20	0	(0)	0	(0)	20	(4.9)	0	(0)
V23	0	(0)	0	(0)	23	(5.6)	23	(14.1)
BMP	0	(0)	1	(0.7)	19	(4.6)	2	(1.2)
total AuNPs	98	(100)	149	(100)	410	(100)	163	(100)
CA ^b	78		93		105		78	
total AuNPs/CA ^b	1.26		1.6		3.9		2.09	

Distribució de les AuNPs en funció del temps

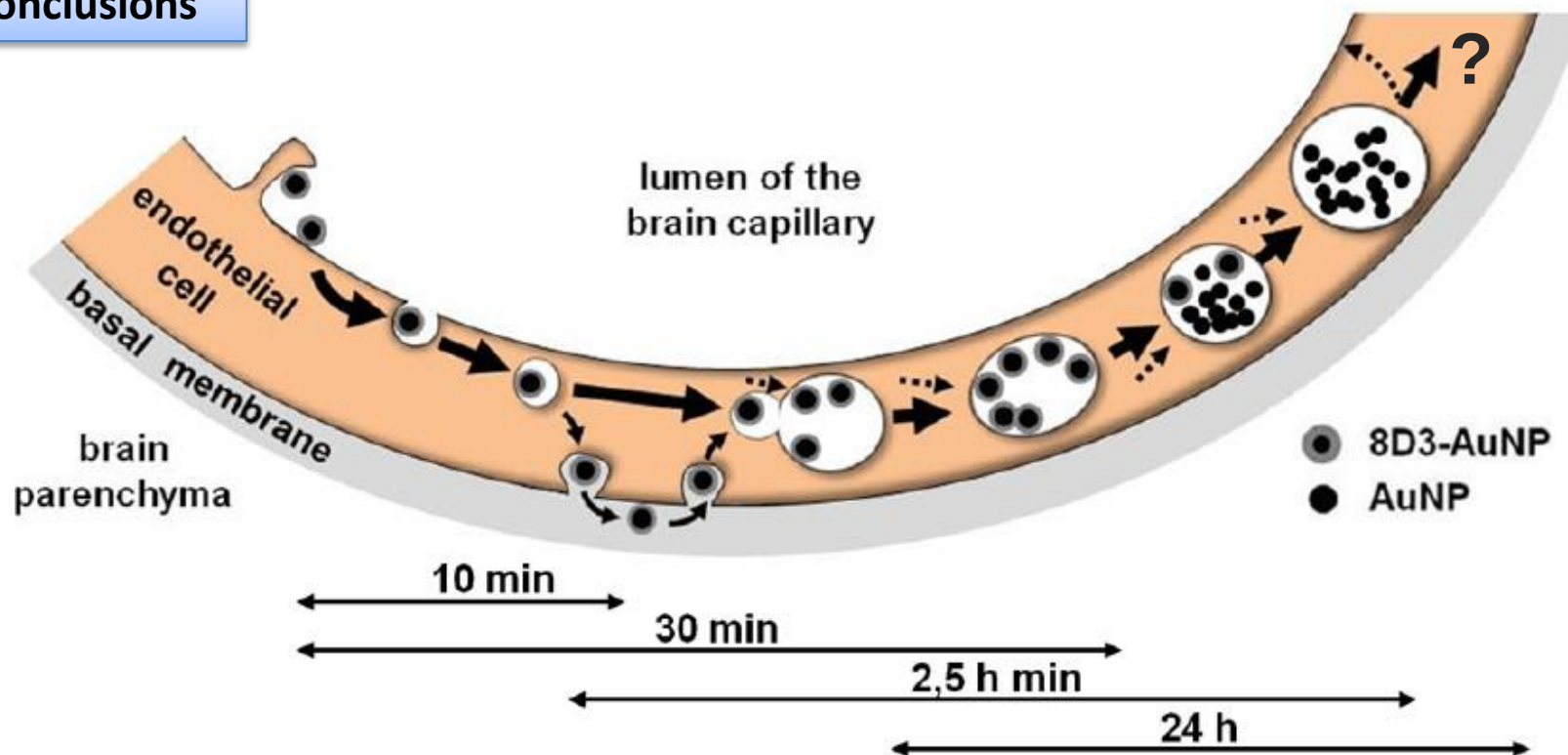
Table 1. Distribution of the Observed AuNPs, Depending on the Location and the Time of Circulation^a

	no. (percentage) of AuNPs in each localization							
	10 min		30 min		2.5 h		24 h	
LMP	12	(12.2)	11	(7.4)	1	(0.2)	0	(0)
CPP	5	(5.1)	4	(2.7)	0	(0)	0	(0)



BMP	0	(0)	1	(0.7)	19	(4.6)	2	(1.2)
-----	---	-----	---	-------	----	-------	---	-------

Conclusions



Trafficking of Gold Nanoparticles Coated with the 8D3 Anti-Transferrin Receptor Antibody at the Mouse Blood–Brain Barrier

Itsaso Cabezón,^{†,‡} Gemma Manich,[†] Raquel Martín-Venegas,[†] Antoni Camins,^{‡,§,||} Carme Pegleri,^{†,||,⊥} and Jordi Vilaplana^{*,†,||,⊥}

[†]Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

[‡]Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

[§]Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^{||}CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, 28031 Madrid, Spain

[⊥]CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, 28031 Madrid, Spain

Histochem Cell Biol
DOI 10.1007/s00418-017-1553-9



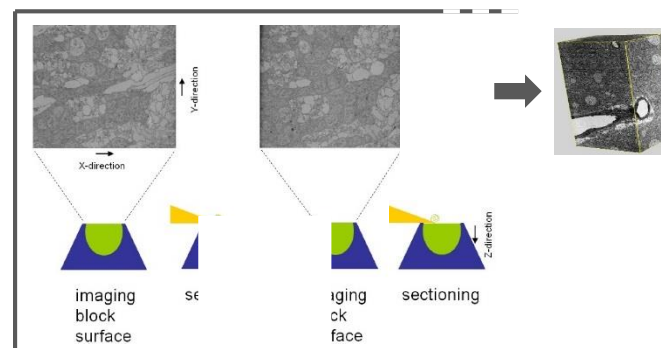
ORIGINAL PAPER

Serial block-face scanning electron microscopy applied to study the trafficking of 8D3-coated gold nanoparticles at the blood–brain barrier

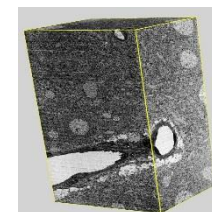
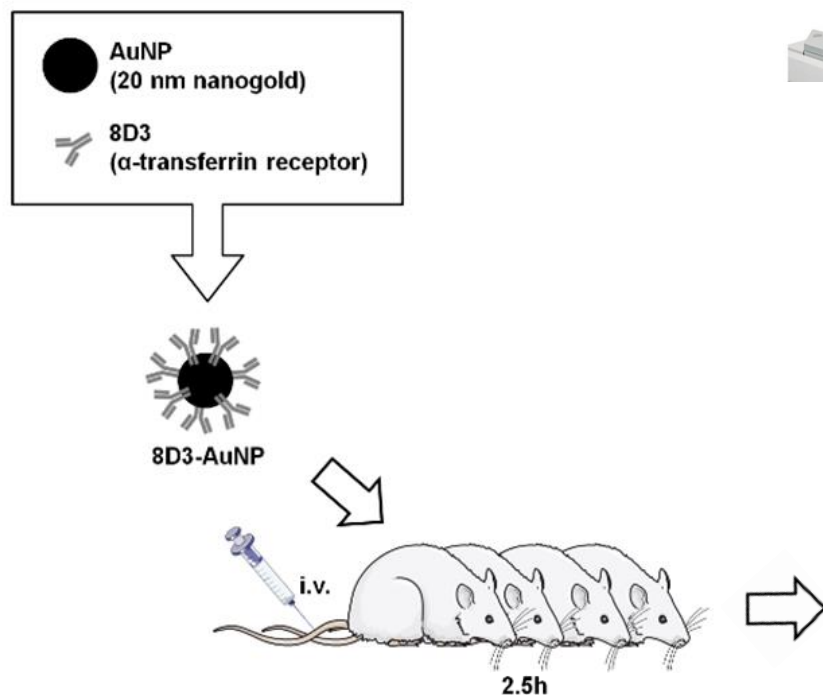
Itsaso Cabezón^{1,2,3} · Elisabet Augé^{1,3} · Manel Bosch⁴ · Alison J. Beckett⁵ · Ian A. Prior⁵ · Carme Pelegrí^{1,3,6} · Jordi Vilaplana^{1,3,6} 



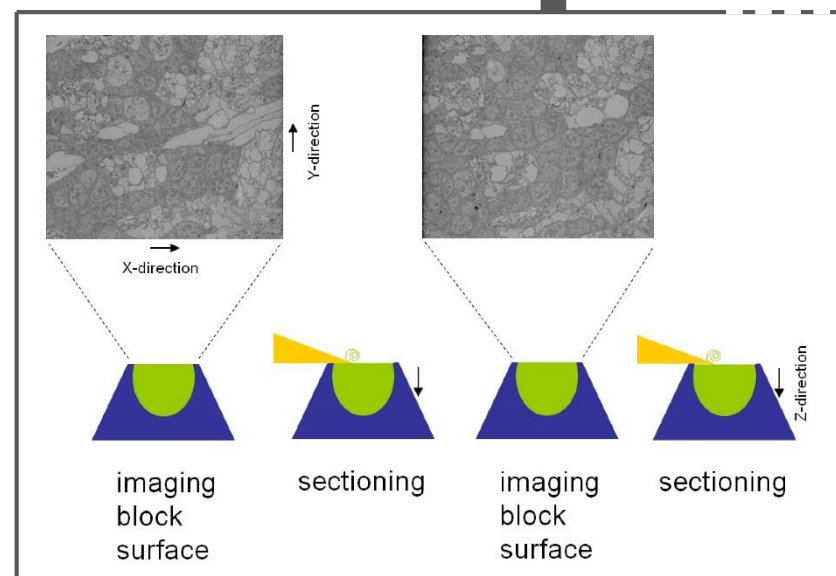
Serial block-face scanning electron microscopy.



Disseny experimental



3D view



Serial block-face scanning electron microscopy.

Division of Cellular and Molecular Physiology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool, UK

Material i mètodes

Formation of the 8D3-AuNP conjugates: *InnovaCoat GOLD Covalent Conjugation Kit*.



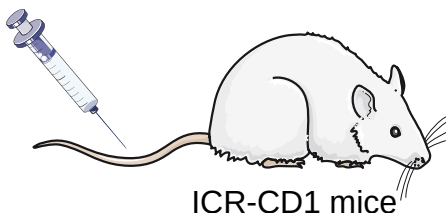
8D3:AuNP ratio: 30:1



Control conjugates: IgG:AuNP

Administración intravenosa

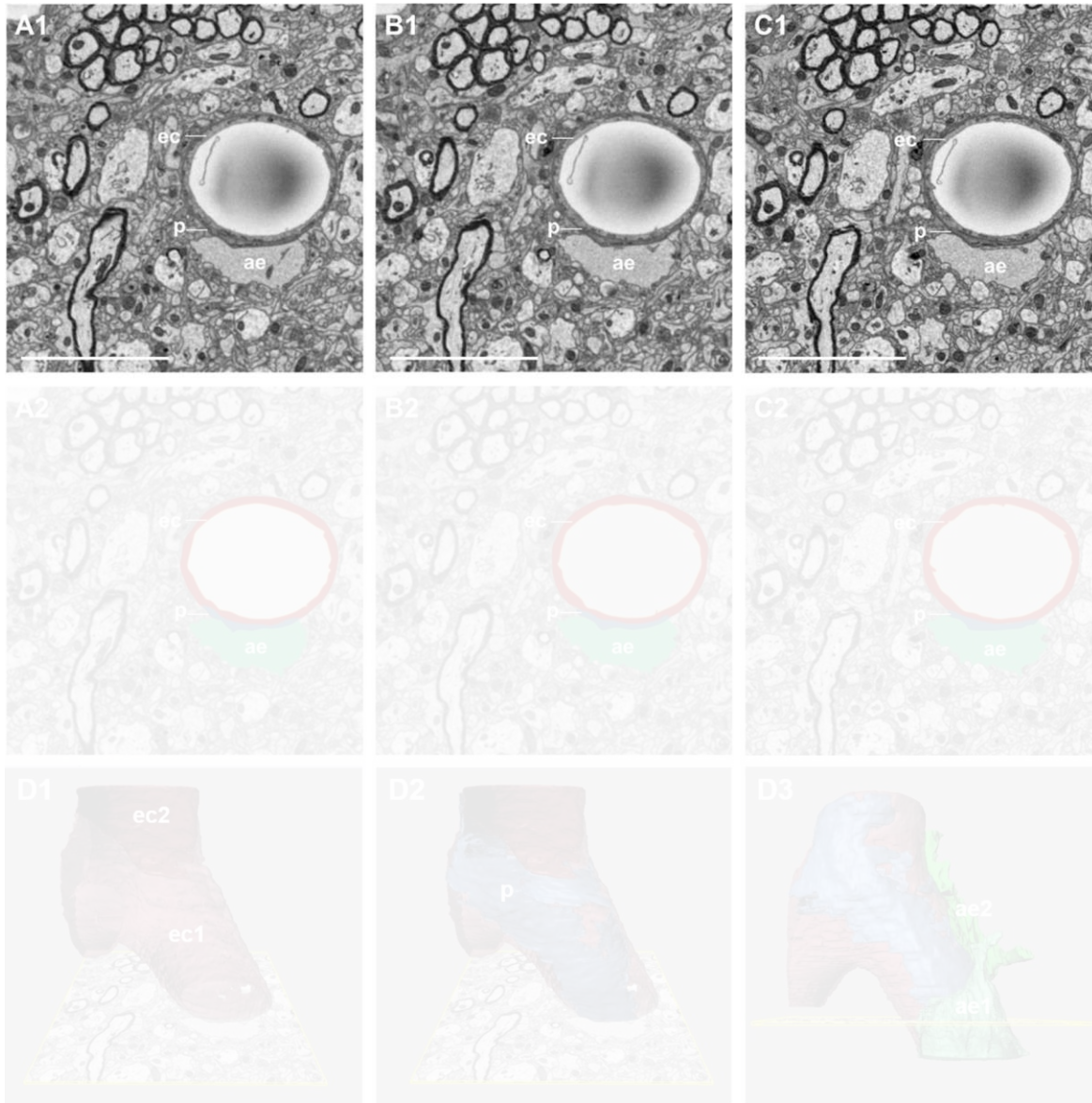
300 μ l 8D3-AuNP
430 μ g 8D3/ml



2,5 h

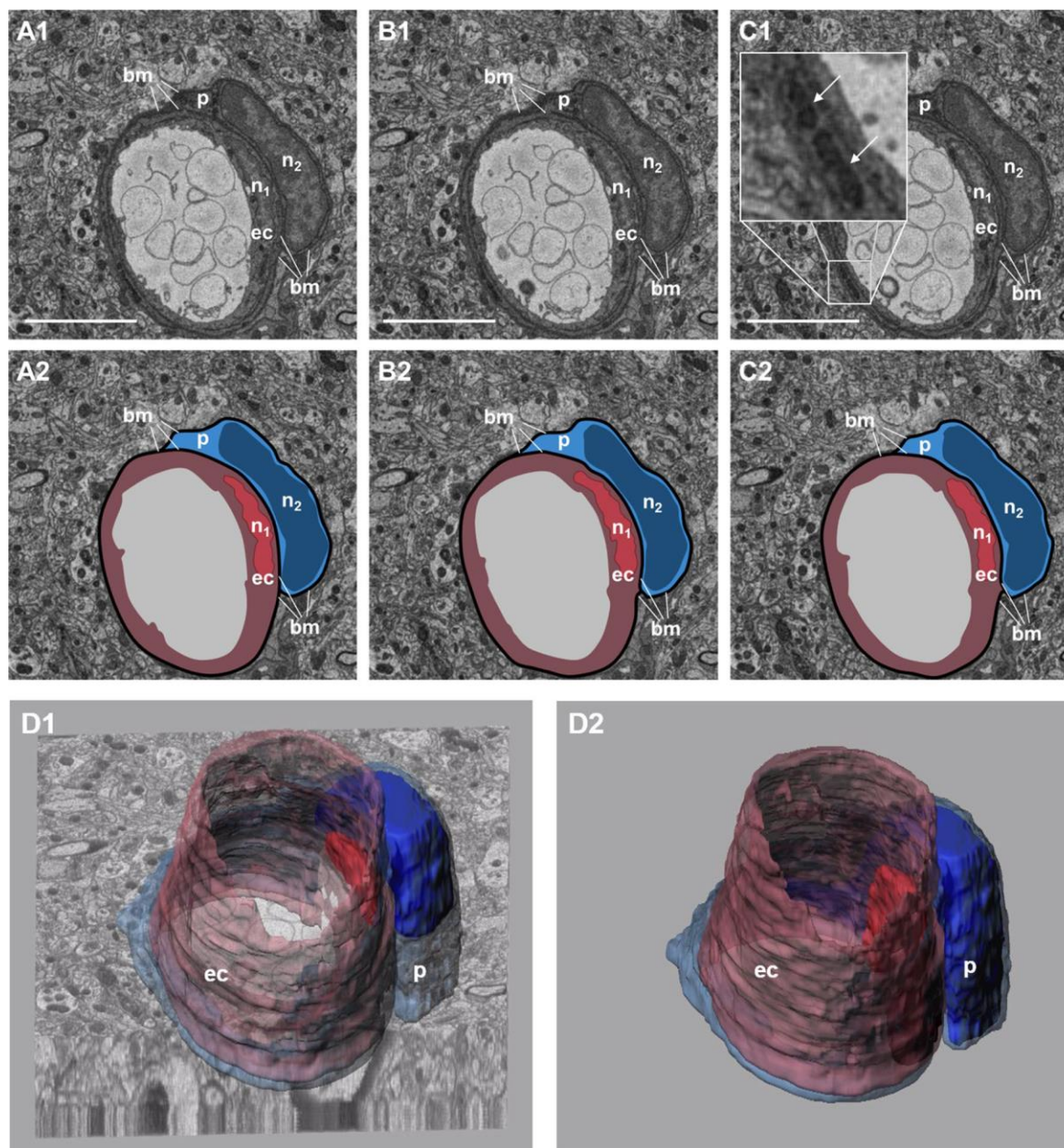
- Intracardially perfused with p-formaldehyde at 4% and glutaraldehyde at 0.1%
- Brains were then removed
- Vibratome
- Post-fixed
- 2% osmium tetroxide containing 1.5% potassium ferrocyanide
- 1% THC
- Stained with 2% OsO_4
- 1% aqueous uranyl acetate
- *En bloc* Walton's lead aspartate staining
- Dehydration
- TAAB Hard Premix resin
- Samples trimmed to a block-face $0.4 \times 0.4 \text{ mm}^2$
- Silver-painted and sputter-coated with gold palladium
- Gatan 3View on a FEI Quanta 250 FEG
- Imaris 8.0.2

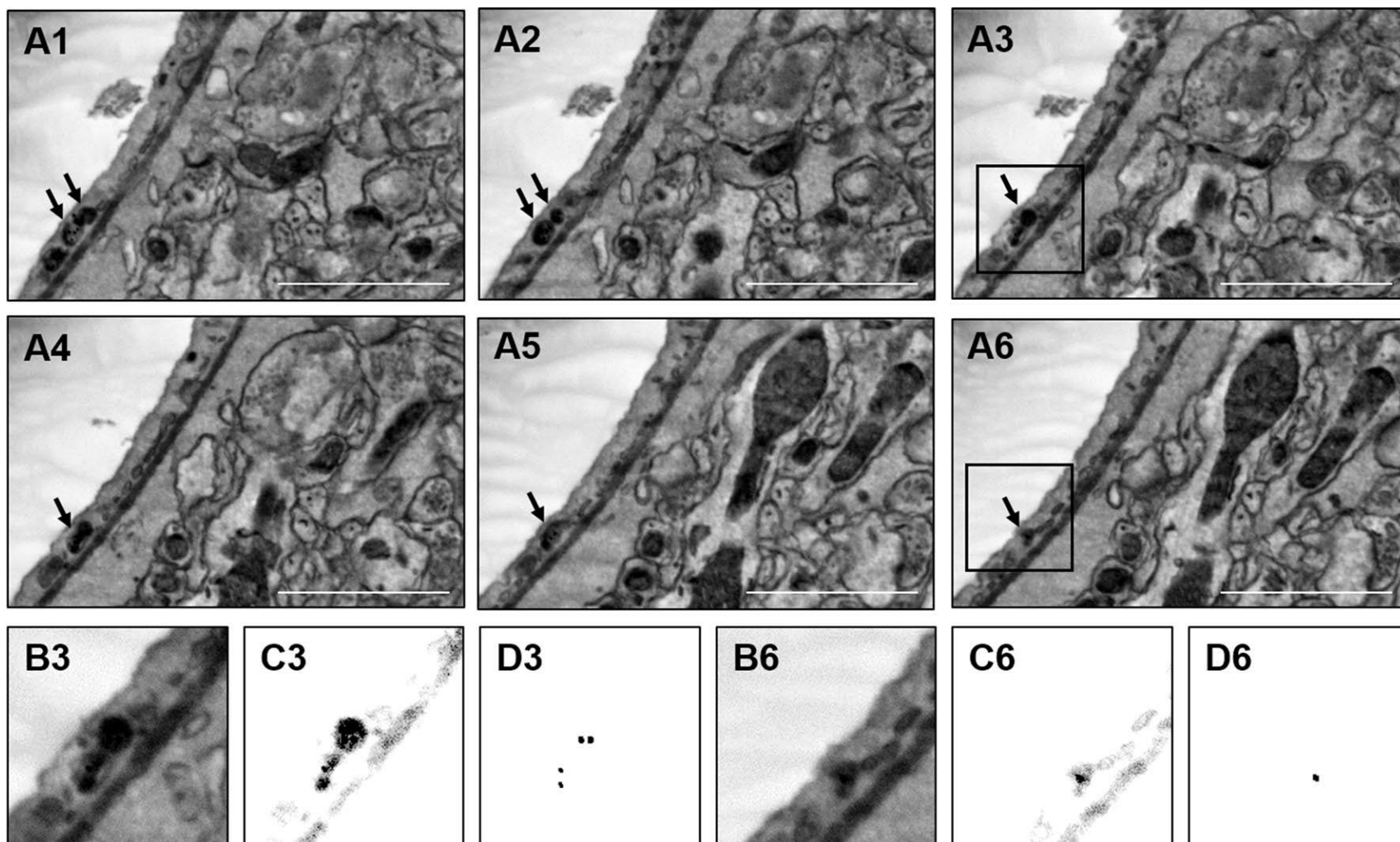


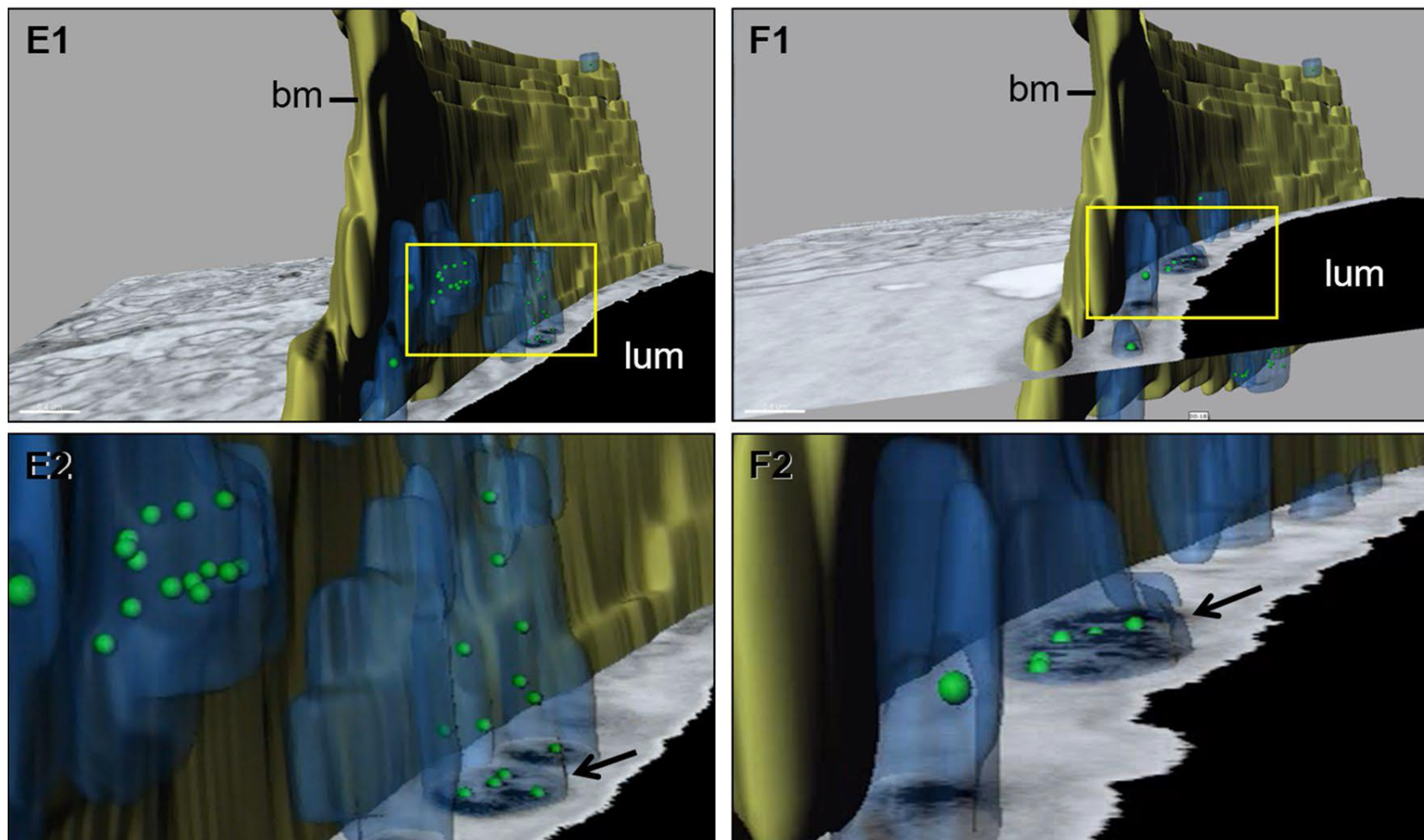


[serial images](#)

[3Dview](#)



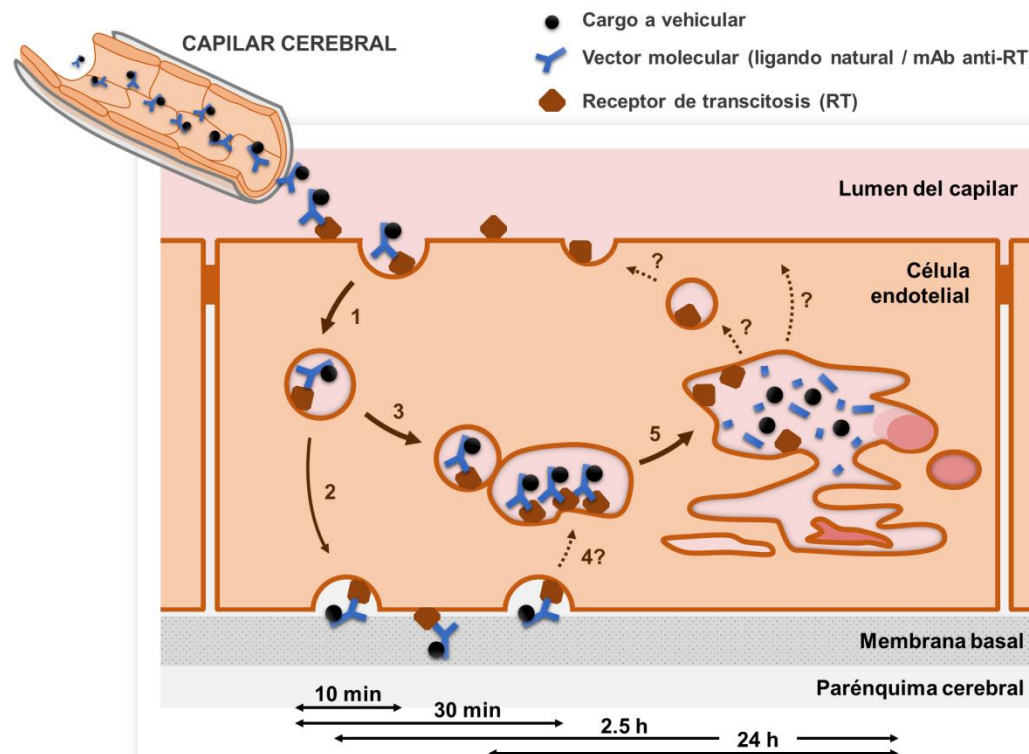
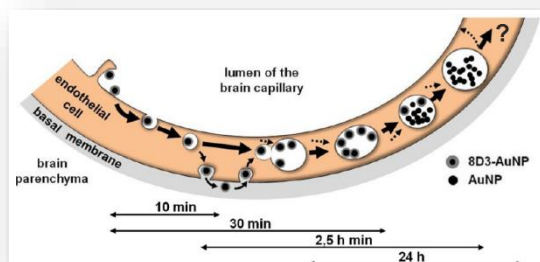




■ AuNP ■ vesicular network ■ basal membrane

[3Dview](#)

Conclusions



Histochem Cell Biol
DOI 10.1007/s00418-017-1553-9



ORIGINAL PAPER

Serial block-face scanning electron microscopy applied to study the trafficking of 8D3-coated gold nanoparticles at the blood–brain barrier

Itsaso Cabezón^{1,2,3} · Elisabet Augé^{1,3} · Manel Bosch⁴ · Alison J. Beckett⁵ · Ian A. Prior⁵ · Carme Pelegri^{1,3,6} · Jordi Vilaplana^{1,3,6}

1. L'anticòs 8D3 és capaç de reconèixer i unir-se al TfR present a la membrana luminal de les cèl·lules endotelials dels capil·lars cerebrals després de la seva administració *in vivo*.
2. L'anticòs 8D3 s'internalitza dins de les cèl·lules endotelials dels capil·lars cerebrals després d'unir-se al TfR.
3. La internalització de l'anticòs 8D3 i la seva càrrega es produeixen mitjançant un procés de endocitosi dependent de clatrina.
4. L'anticòs 8D3 és capaç d'internalitzar la càrrega a la qual es conjuga, superant el primer obstacle en el transport a través de les cèl·lules endotelials dels capil·lars cerebrals.
5. La càrrega interioritzada pot variar en grandària i naturalesa, des de proteïnes com els fragments d'anticossos Fab' fins a partícules més grans com AuNPs de 20 nm de diàmetre.
6. La major part de les vesícules endocítiques resultants es processen intracel·lularment i no es completa la transcitosi.
7. Aquestes vesícules experimenten un procés de fusió, maduració i reorganització en el qual els complexos 8D3-càrrega que hi ha a l'interior s'acumulen progressivament en xarxes endosòmiques de gran complexitat.
8. Durant el processament d'aquestes vesícules es perd la interacció entre el TfR, el 8D3 i/o la càrrega.

9. Un petit percentatge de les vesícules endocítiques que contenen el complex 8D3-càrrega completen la transcitosi i arriben a la membrana basal.
10. Els complexos 8D3-càrrega que completen la transcitosi no es separen del TfR i, per tant, la càrrega arriba a la membrana basal, però no arriba més enllà.
11. El coneixement que s'obté al voltant dels mecanismes i dinàmiques intracel·lulars que aquest anticòs experimenta a la BHE fa pensar que, un cop optimitzat l'immunocomplex, pot ser útil per a la vehiculació de substàncies.
12. L'ús del sistema de transport mediat per receptors i anticossos dirigits contra receptors de transcitosi és una estratègia amb un gran potencial per transportar fàrmacs a través de la BHE.

