

Diomune SL
C/ Felix Boix N°9 4ºC
28736 Madrid (SPAIN)
Tel: +34 91 806 46 56
info@diomune.com



Diomune SL: Presentación de Servicios externos.

Somos una empresa biotecnológica especializada en investigación y desarrollo de nuevos tratamientos inmunológicos de aplicación en salud humana y animal, en enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunes. Contamos con aliados estratégicos en el sector público, con el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM) de Madrid a la cabeza, y en el sector privado con empresas veterinarias y farmacéuticas de reconocido prestigio.

Esto nos ha facilitado el rápido desarrollo de nuestros principales Proyectos, y en paralelo un considerable *know-how* que ponemos a disposición de nuestros clientes. Nuestro equipo multidisciplinar constituye nuestro activo más importante, su gran implicación en el trabajo y la ilusión por qué nuestros productos puedan ofrecer un beneficio a la sociedad, son nuestra principal motivación.

Actualmente, estamos certificando la calidad de nuestros servicios mediante Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs), para ponerlo al servicio de nuestros clientes en la mayor brevedad posible.

La oferta de servicios biotecnológicos disponibles en Diomune se centran fundamentalmente en:

- A. Modelos animales de sepsis, leishmaniosis, cáncer, inflamación, enfermedades autoinmunes (artritis, psoriasis,...), arterosclerosis, cirrosis hepática, etc.
- B. Monitorización de drogas terapéuticas (MDT) y ensayos de toxicidad: evaluación de la eficacia y seguridad de compuestos en fase pre-clínica.
- C. Estudios de eficacia farmacológica completos para sepsis, leishmaniosis, y otros modelos animales bajo consulta.
- D. Diseño de kits de diagnóstico molecular.
- E. Diseño de vacunas, expresión y purificación de proteínas recombinantes a pequeña, mediana (hasta 30 litros) y gran escala (hasta 1000 litros).
- F. Virología: estudios básicos de patogénesis viral.
- G. Productos de Biología Molecular: LPS *Escherichia coli*, Células electrocompetentes, DioTaq polimerasa, proteinogramas, etc.

Diomune al igual que nuestros clientes se encuentra en continua evolución, por ello en cada momento pueden actualizarse los servicios ofertados e incluso estudiarse las necesidades específicas de cada cliente. Para más información y contacto puede consultarse www.diomune.com o escribir a info@diomune.com.

A. MODELOS ANIMALES

En Diomune SL tenemos recursos y una contrastada experiencia en estudios *in vivo* e *in vitro* completos, totalmente controlados y estandarizados.

1) Sepsis: Actualmente disponemos de los 3 principales modelos animales para el desarrollo y estudio de la sepsis:

- Modelo de shock tóxico por administración de LPS.
- Modelo de septicemia por *Escherichia coli*.
- Modelo de septicemia por CLP (*Cecal Ligation and Puncture*).

2) Leishmaniosis: disponemos de modelos murinos de Leishmaniosis (*Leishmania major*), tanto para una observación directa, como una cepa de *Leishmania* genéticamente modificada para la expresión de la *cherry fluorescent protein* (CFP), que nos permite realizar estudios de alta sensibilidad con la tecnología del IVIS, sistema de análisis de imágenes de alta resolución que permite estudiar con gran detalle la evolución de la enfermedad sin necesidad de sacrificar al animal.

3) Inflamación e Inmunología: En Diomune disponemos de un amplio catálogo para el estudio de respuestas inmunes innatas y adquiridas, pudiendo analizarlo en sistemas murinos y humanos, ya sea con cultivos primarios o líneas celulares. Los servicios *in vivo* son ofertados en colaboración con el grupo del CBMSO del Dr. Manuel Fresno. Estos servicios se basan en modelos bien aceptados por la comunidad científica internacional y están adaptados para los estudios preclínicos de nuevas moléculas. Aparte de los ensayos de toxicidad *in vivo*, ofertamos los siguientes modelos animales:

- Inflamación aguda por carragenina.
- Artritis reumatoide (ratones Cepa Db1j).
- Peritonitis inducida por tioglicolato (migración *in vivo* de neutrófilos).
- Proliferación de linfocitos T y B (tinción con BrdU).
- Cáncer de colón asociado a colitis.
- Trasplante ortotópico de tumores.
- Psoriasis.
- Simulación de Cirrosis hepática (ver sección 5)
- Asma.
- Otros modelos específicos ([solicitar información](#)).



4) Síndrome metabólico y obesidad: El síndrome metabólico es una entidad clínica que aparece, con amplias variaciones fenotípicas, en personas con una predisposición endógena, determinada

genéticamente y condicionada por factores ambientales. Disponemos de una plataforma específica para el screening y estudio de compuestos dirigidos contra diferentes dianas moleculares que intervienen en la fisiopatología del síndrome metabólico.

- Modelos experimentales de diabetes.
- Modelos experimentales de obesidad inducida por dieta.
- Modelos genéticos de diabetes.
- Arteriosclerosis por dieta hipercolesterolémica.

5) Cirrosis hepática: Disponemos de modelos en rata para la simulación de cirrosis hepática por dificultad de entrada de sangre, ya sea Prehepática por ligadura parcial o total de la vena porta y triple ligadura portal estenosante; Intrahepática por inhalación de tetracloruro de carbono, por déficit de colina o por dimetil nitrosamina; o Suprahepática por ligadura de la vena cava inferior suprahepática.

6) Hipertensión pulmonar por inyección de monocrotalina.

7) Hipoxia postnatal.

8) Endotoxemia (LPS).

9) Daño pulmonar agudo (LPS intratraqueal).

10) Rata espontáneamente hipertensa.

11) Rata diabética (tipo I por inyección de estreptozotocina).

12) Hemodinámica en rata. Registro de presión arterial sistémica y pulmonar (torax abierto), volumen minuto, frecuencia, saturación de O₂.

Además, disponemos de una amplia variedad de líneas celulares (Macrófagos) y animales (ratones con base genética Balb-c), por ejemplo, deficientes para TLR2⁻, TLR4⁻ y TLR2/4^{-/-}. Estos *knock out* son muy útiles en el estudio de la inflamación y mecanismos de actuación de fármacos. Consulte su necesidad con nuestro equipo técnico (Ver sección B).

A continuación se incluye la lista de los ratones *knock out* de los que dispone DIOMUNE:

- ApoE KO (B6.129P₂-ApoE^{tm1})
- COX2 KO (B6;129S-Ptgs2^{tm1})
- ApoE/COX2 doble ko
- EP2 KO (B6.129-Ptger2^{tm1})
- EP4 KO (B6;129-Ptger4^{tm1})
- NFATc3 KO (BALB/c-Nfatc3^{tm1})
- NFATc4 KO (B6.129S7-Nfatc4^{tm1})
- SLAM KO (BALB/c-Slamf1^{tm1})
- TLR2 KO (B6-Tlr2^{tm1})

- TLR4 KO (B6-Tlr4^{tm1})
 - TLR2/TLR4 doble ko
 - Gal1 KO (B6.Cg-Lgals1^{tm1})
 - Gal3 KO (B6.Cg-Lgals3^{tm1})
 - Gal9 KO (B6.Cg-Lgals9^{tm1.1})
 - IFNgR KO (B6-Ifngr1^{tm1})
-

Todos los modelos se acompañan de estrictos sistemas de validación y control:

- Ensayos microbiológicos
- Determinaciones de glucosa y ácido láctico en suero.
- Estudio de citoquinas en sobrenadante de cultivo.
- Estudios de proliferación celular.
- Estudios de apoptosis.
- Estudios de evolución de subpoblaciones celulares (CD3+, CD4+, CD8+, MHCII, CD11, CD19, etc.) por Citometría de flujo de sangre periférica y esplenocitos.
- Estudio de índices organosomáticos.
- Bioquímica completa.
- Puede complementarse y/o combinarse con cualquiera de las pruebas de la Sección B.

Con estas secciones, ponemos a disposición de nuestros clientes la validación preclínica de fármacos, compuestos antiinflamatorios e inmunomoduladores, los cuales pueden acompañarse de pruebas específicas de cada campo, que se detallan en el siguiente apartado.

B. MONITORIZACIÓN DE DROGAS TERAPÉUTICAS (MDT) Y ENSAYOS DE TOXICIDAD

Diomune S.L. desarrolla ensayos pre-clínicos *in vivo* para la evaluación de la seguridad y eficacia de fármacos de interés y así establecer los regímenes terapéuticos óptimos para el beneficio del paciente.

- Medición de signos vitales:
 - Peso corporal
 - Temperatura corporal
 - Índice organosomático (IOS)
- Medición de creatinina en suero y análisis de nitrógeno ureico en la sangre (BUN)
- Medición de creatinina en orina
- Cálculo de la eliminación de creatinina
- Farmacocinética compartimental:
 - Administración:

- Enteral: oral, rectal
 - Parenteral: intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, tópica, intratecal, pulmonary.
 - Absorción: medición de la fracción y la velocidad a la cual la dosis administrada de un fármaco alcanza su diana terapéutica (biodisponibilidad)
 - Distribución: medición de la concentración del fármaco en fluidos biológicos y órganos a distintos tiempos después de su administración
 - Metabolismo y excreción:
 - Constante de eliminación
 - Eliminación
- Cálculo del Nivel del Efecto Biológico Mínimo Anticipado (MABEL): determinación de la concentración de uso seguro y con efecto terapéutico deseado del fármaco para el establecimiento de un óptimo tratamiento en el paciente.



C. ESTUDIOS DE EFICACIA FARMACOLÓGICA

Ofertamos un amplio portafolio de protocolos para evaluar las respuestas inmunes naturales y específicas tanto en células primarias (humanas y murinas) como en líneas celulares linfoides. Con esto se obtiene el complemento perfecto para los modelos animales de estudio de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, cáncer y demás posibilidades. Por tanto, nuestros modelos “*in vivo*” e “*in vitro*” son idóneos para la validación preclínica de compuestos antiinflamatorios e inmunomoduladores y fármacos en general.

Tipos Celulares disponibles:

- Células linfoides primarias humanas y murinas (linfocitos T, B, monocitos, granulocitos y células NK)
- Células dendríticas
- Células endoteliales primarias
- Miocitos de arteria pulmonar
- Líneas transformadas: Linfoides, endoteliales y sinoviales
- Cáncer: disponemos de un amplio panel de líneas celulares tumorales de distintos orígenes (linfoides, mama, pulmón, colón, próstata, cerebro, hígado, etc.) para el estudio preclínico de fármacos. Estas líneas celulares son comúnmente utilizadas para los estudios de compuestos antitumorales y para el estudio de sus mecanismos de acción específicos (dianas farmacológicas).
- Otros tipos celulares ([Solicitar información](#)).

Tejidos disponibles:

- Arterias sistémicas de rata y humano en cultivo.
- Arterias pulmonares de rata, ratón, embrión de pollo y humanas.
- Ductus arteriosus humanos.

A continuación se enumeran los principales ensayos realizados para complementar los estudios in vivo y modelos animales:

- ✓ Test de compuestos inflamatorios
 - Determinación de prostaglandinas y leucotrienos por ELISA. Determinación de actividad COX-1 y COX-2.
 - Determinación de citoquinas proinflamatorias (ELISA, qRT-PCR y citometría de flujo).
 - Estudios de activación en macrófagos (iNOs, COX-2, Citoquinas, PGs, etc.)
- ✓ Biología celular
 - Metabolismo de NO y determinación de ROS. Análisis de especies reactivas de oxígeno y peroxinitritos
 - Proliferación y estudios de ciclo celular en células primarias (linfocitos)
 - Estudios de fagocitosis (neutrófilos, monocitos y células dendríticas)
 - Actividad de factores de transcripción y regulación génica (NF-κB, NF-AT, AP-1, SP1, STAT3...)
 - Estudio de ciclo celular (citometría de flujo)
 - Ensayos de co-localización y traslocación celular de proteínas
 - Determinación actividad transcripcional de PPARs
 - Ensayos de invasividad en Matrigel
 - Imágenes tridimensionales y análisis morfométricos
 - Captación de glucosa en respuesta a insulina
 - Determinación de lipólisis
 - Co-cultivos adipocitos/macrófagos
- ✓ Señalización celular
 - Estudios de señalización, MAPKs (ERK 1/2, p38, JKN/SAPK); PKCs; Actividad Calcineurina; ensayos de activación de ciclinas, tirosina quinasas, ubiquitinación, sumolización, etc.
 - Determinación de marcadores de activación (citometría de flujo)
 - Ensayos de migración.
 - Actividad NK.
 - Estudios de señalización (calcio, pH, etc.).
 - Estudios de diferenciación de adipocitos en 3T3-L1
 - Ensayos de migración
 - Estudios de señalización. Identificación de dianas moleculares
- ✓ Apoptosis
 - Determinación de rutas apoptóticas. Potencial de mitocondria y liberación de mediadores proapoptóticos (citocromo-C, AIF).
 - Estudio de actividad de caspasas efectoras.
 - Determinación de citotoxicidad (MTT, XTT, LDH, Yoduro de propidio), apoptosis y necrosis.
 - Fragmentación de ADN (TUNEL).
- ✓ Parámetros vasculares
 - Registro de corrientes iónicas y potencial de membrana. Corrientes de K y Ca en células



- aisladas (miocitos vasculares de arterias pulmonares y sistémicas aislados en fresco y en cultivo)
- Registro de calcio intracelular simultánea con contractilidad vascular. En anillos arteriales (fluorescencia de fura-2).
 - Registro de contractilidad vascular. En arterias pulmonares y sistémicas de conductancia y resistencia.
 - Determinación de NO y especies reactivas de oxígeno. Dihidroetidina (superóxido) y diclorofluoresceína (peróxido), DAF-2 (NO) y otros.... En arterias, células o cortes histológicos. NO extracelular mediante electrodo amperométrico.
- ✓ Otros parámetros ([solicitar información](#))

D) DISEÑO DE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

En DIOMUNE diseñamos kits rápidos de diagnóstico molecular en base a las necesidades específicas de nuestros clientes. Cada kit diseñado va acompañado de una estricta validación que incluye la determinación del límite de detección, sensibilidad y especificidad.

El diseño de kits de diagnóstico molecular que ofrece DIOMUNE están basado en:

- **Detección de ácidos nucleicos:** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional y PCR cuantitativa)
 - Genotipado.
 - Análisis de polimorfismos.
 - Genómica (microarrays).
 - Expresión de miRNAs.
 - Silenciamiento génico, siRNA.
- **Inmunoensayos**
 - Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Localización de proteínas en células y cortes histológicos.
 - Western blot.
 - Interacciones proteína-proteína (co-inmunoprecipitación).
 - Electroforesis bidimensional.
 - Inmunoensayo enzimático (ELISA).

E) DISEÑO Y EXPRESIÓN DE VACUNAS



Asesoramiento en el diseño de vacunas. Puesta a punto de expresión y purificación de proteínas recombinantes. Nuestro *staff* científico posee más de 5 años de experiencia en el diseño, clonaje, purificación y estudios preclínicos de vacunas de base peptídica. Asesoramos las mejores construcciones, con un completo estudio *in silico* predictivo de punto isoeléctrico, hidrofobicidad, conformación tridimensional y otros factores implicados en el tipo y potencia de la respuesta inmune desencadenada por la vacuna.

Para su clonaje, expresión y purificación ponemos a disposición cepas de bacteria para clonaje y expresión y levadura de alta eficacia, libres de proteasas, etc. Por último en Diomune podemos llevar a cabo no solo el estudio de rendimiento, sino el aumento de escala con fermentadores desde 30 a 1000 litros.

F) VIROLOGÍA

Nuestro equipo científico tiene extensa experiencia en virus humanos, animales, de plantas y bacterias, como West Nile (WNV), Hepatitis E (HEV), Circovirus Porcino (PCV), Plum Poxvirus (PPV), Tobacco Vein Mottling virus (TVMV), Potato virus X (PVX), y el bacteriofago T7. Los principales servicios en virología que ofrece DIOMUNE son:

1. Producción de stocks y antígenos virales
2. Titulación viral (ensayo de placas, TCID₅₀) y purificación de virus
3. Test de cinética de crecimiento
4. Aislamiento de virus de muestras biológicas
5. Ensayos de diagnóstico: cuantificación de carga viral mediante PCR cuantitativa (qPCR) en muestras biológicas (suero, tejidos, heces, etc.) y muestras ambientales (agua, etc.); detección de anticuerpos frente a virus (ELISA)
6. Infección, transfección, and detección de antígenos virales mediante ensayos de inmunofluorescencia (IFA)
7. Diseño de vacunas virales basadas en proteínas antigénicas



G) PRODUCTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

En Diomune disponemos de nuestras propias herramientas y las ofertamos con una alta competitividad:

- LPS de Escherichia coli para estudios de toxicidad *in vivo* o *in vitro*. Pureza del 99% con una dosis letal en modelos murinos *in vivo*, 10 veces inferior al de otras marcas comerciales.
- Enzima Taq polimerasa, DioTaq, desde 250 unidades
- Preparación de células electrocompetentes, con disponibilidad inmediata de la cepa EC100, y cualquier línea celular bajo petición.
- Elaboración de proteinogramas en varias especies animales.
- Diseño y puesta a punto de ELISA y Western Blot.
- Titulación de anticuerpos.
- Diseño y clonaje de proteínas recombinantes.



Expónganos su necesidad, nosotros nos encargamos de las soluciones.

Equipo Diomune SL.

Diomune SL

www.diomune.com

info@diomune.com

C/ Felix Boix Nº9 4ºC

28736 Madrid (SPAIN)

Tel.: +34 91 806 46 56