

CONVOCATORIA DE PROYECTOS DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD

Expediente N°

TITULO: Detección de fusiones génicas patognomónicas en sarcomas mediante secuenciación masiva para mejorar el diagnóstico, la estratificación y el tratamiento de los pacientes

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

TIPO DE PROYECTO: INDIVIDUAL COORDINADO

NOMBRE DEL IP COORDINADOR:
(Cumplimentar sólo en caso de proyectos coordinados)

DURACION: 2 AÑOS

Categoría del proyecto (marcar solo una opción):

- Proyectos de desarrollo basados en unos resultados o experiencias preliminares ya contrastados y que muestren potencial de transferencia al SNS.
- Proyectos para desarrollar tecnologías innovadoras en salud, incluidos productos sanitarios, servicios, herramientas de diagnóstico, software médico y/o de gestión o nuevas terapias.
- Proyectos que requieran validación clínica y/o tecnológica de una tecnología sanitaria desarrollada.

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

RESUMEN (Objetivos del Proyecto)

(Ajustese al espacio disponible)

Aproximadamente 30 tipos de sarcomas se caracterizan por la presencia de 94 tipos de fusiones génicas patognómicas derivadas de translocaciones cromosómicas. Muchas de ellas son relevantes en el proceso de sarcomagénesis, además de ser muy útiles como biomarcadores diagnósticos. Aunque bastantes sarcomas pueden identificarse bien en base al inmunofenotipo y la localización anatómica, la detección a nivel molecular de estos genes de fusión es esencial para el diagnóstico anatomopatológico correcto de las distintas entidades, y por tanto para asignar los regímenes de tratamiento adecuados. Las técnicas actuales de rutina para detectar estas alteraciones incluyen la hibridación fluorescente in situ (FISH) y la RT-PCR. Ambas técnicas requieren un tiempo y trabajo considerable, y no permiten análisis *multiplex*, es decir, no es posible hacer escrutinios de múltiples reordenamientos/genes de fusión de forma simultánea cuando el diagnóstico es incierto. Estas limitaciones pueden salvarse con la tecnología de secuenciación masiva o NGS (*Next Generation Sequencing*). La empresa colaboradora *ArcherDX, Inc.* (Boulder, CO, USA) ha desarrollado recientemente un sistema que permite la detección simultánea de varias fusiones génicas en una misma reacción (optimizando el recurso de la muestra), y la detección de fusiones de un gen con diversos *partners* (conocidos o no). En esta propuesta pretendemos **adaptar y validar clínicamente como herramienta diagnóstica dicho sistema** para identificar las fusiones génicas en muestras parafinadas provenientes de cuatro ensayos clínicos de tres tipos de sarcomas (sarcoma Ewing-like, tumor fibroso solitario, liposarcoma mixoide) promovidos por el Grupo Español de Investigación en sarcomas (GEIS). Evaluaremos la especificidad y sensibilidad de la técnica, comparada con las que utilizan actualmente de forma rutinaria y la relación de sus resultados con la respuesta al tratamiento. Paralelamente, esta aproximación permitirá además la **identificación de nuevos genes de fusión**, en sarcomas como el sarcoma pleomórfico indiferenciado, que hasta ahora se consideran t-negativas (sin translocación) y que pudieran ser dianas terapéuticas.

TITLE: Detection of pathognomonic gene fusions in sarcomas by next-gen sequencing to enhance diagnosis, subclassification, and treatment of patients

ABSTRACT (Objectives of the project)

About 30 types of sarcomas are characterized by the presence of 94 types of gene fusions derived from pathognomonic chromosomal translocations. Many of them are relevant in the process of sarcomagenesis, besides being useful as diagnostic biomarkers. Although many sarcomas can be well identified based on their immunophenotype and anatomical localization, detection at the molecular level of these fusion genes is essential for the accurate diagnosis of different pathological entities, and therefore to assign appropriate treatment regimes. Current routine techniques to detect these alterations include fluorescence in situ hybridization (FISH) and RT-PCR. Both techniques are labor intensive and time consuming require considerable time and work, and do not allow multiplex analysis, ie, it is not possible to scrutiny multiple rearrangements / fusion genes simultaneously when the diagnosis is uncertain. These limitations can be potentially overcome with Next Generation Sequencing. Our partner company *ArcherDX, Inc.* (Boulder, CO, USA) has recently developed a system that allows the simultaneous detection of several gene fusions in a single reaction (optimizing the use of the sample), and the detection of genes fusions including a known gene with various partners (known or unknown). This proposal aims to **adapt and validate clinically as a diagnostic tool** such a system to identify gene fusions in paraffin-embedded samples from four clinical trials including three types of sarcomas (Ewing-like sarcoma, SFT, myxoid liposarcoma) sponsored by the Spanish Group research on sarcomas (GEIS). We will evaluate the specificity and sensitivity of the technique, compared with the ones currently used in routine, and the relationship of their results with treatment response. Similarly, this approach will also allow the **identification of novel fusion genes** (which could be potential therapeutic targets) in sarcomas such as undifferentiated pleomorphic sarcoma, hitherto considered t-negative (no translocation).

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Finalidad del proyecto, antecedentes y estado actual de los conocimientos científico-técnicos. Desarrollos análogos nacionales o internacionales.

Citar las referencias en el apartado siguiente: Bibliografía más relevante.

Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)

La atención a los pacientes con sarcomas, por su baja frecuencia y complejidad radiológica e histopatológica, así como por las serias consecuencias que se originan por biopsias y tratamientos inadecuados, se debe realizar por profesionales con experiencia. Muchos sarcomas requieren técnicas especiales para su correcto diagnóstico anatomopatológico. Aproximadamente la mitad de los sarcomas se caracterizan por la presencia de fusiones génicas patognomónicas derivadas de translocaciones cromosómicas (ver imagen en el Anexo). Algunos ejemplos bien conocidos son las fusiones *EWSR1-ETS* (predominantemente *EWSR1-FLI1* y *EWSR1-ERG*) en Sarcoma de Ewing, *PAX3-FOXO1* y *PAX7-FOXO1* en rhabdomyosarcoma alveolar, *EWSR1-WT1* en el tumor desmoplásico de células redondas, o *ETV6-NTRK3* en el fibrosarcoma infantil. Existen unos 30 tipos de sarcomas con 94 tipos diferentes de fusiones génicas, para muchas de ellas se ha establecido un papel relevante en el proceso de sarcomagénesis, además de ser muy útiles como biomarcadores (Mertens & Tayebwa, 2014; Smith et al, 2015). La reciente aplicación de las tecnologías *high throughput*, como la secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing) está permitiendo identificar nuevos genes de fusión como *NAB-STAT6* en el tumor fibroso solitario, *BCOR-CCNB3* en sarcomas Ewing-like, o *YAP1-TFE3* en el hemangioendotelio epitelioide (Deel et al, 2015). De hecho, en la medida que la progresión en la caracterización molecular se está acelerando, podría producirse un cambio gradual en el paradigma actual de la clasificación tradicional de los sarcomas basada en el tejido de origen. De esta forma, la definición de translocaciones cromosómicas recurrentes adquirirá un mayor protagonismo como referencia para la clasificación de las entidades diagnósticas. La detección a nivel molecular de estos genes de fusión es esencial para el diagnóstico anatomopatológico correcto de las distintas entidades, y por tanto para asignar los regímenes de tratamiento adecuados.

Aunque bastantes sarcomas pueden identificarse bien en base al inmunofenotipo y la localización anatómica, muchos de ellos son difíciles de diagnosticar usando exclusivamente las técnicas de rutina disponibles actualmente en los laboratorios de anatomía patológica. Algunos tipos concretos de sarcomas presentan particularidades por las que necesitamos herramientas de diagnóstico molecular nuevas y más precisas: i) Es el caso del grupo de sarcomas *Ewing-like* (Fletcher et al, 2013), en los que se están descubriendo nuevos tipos de fusiones génicas y se desconoce por el momento la prevalencia de las fusiones ya descubiertas. ii) Una segunda situación de interés, que supone un reto para el diagnóstico, es la heterogeneidad de la estructura molecular de las fusiones génicas dentro de la misma entidad, según el número de exones que aporta cada uno de los genes implicados en la fusión. Es el caso del tumor fibroso solitario y las fusiones *NAB2-STAT6*, o los diversos tipos de fusiones *DDIT3-CHOP* en el liposarcoma mixoide. Es interesante que en este último se encontrara, gracias a un pequeño estudio retrospectivo, una relación entre la estructura molecular de la fusión y la sensibilidad a Trabectedina (Grosso et al, 2007). Carecemos sin embargo de conocimiento sistemático que relacione los subtipos moleculares de las fusiones con la sensibilidad a fármacos. iii) Otra situación clínica relevante es la de los sarcomas pleomórficos indiferenciados. El diagnóstico de esta entidad se establece por exclusión de otras entidades, y desconocemos si existen fusiones génicas en este grupo tumoral; es muy probable que al tratarse de un grupo heterogéneo de tumores no contemos con fusiones génicas patognomónicas útiles para el diagnóstico, pero no es inverosímil que encontremos fusiones génicas que incluyan genes susceptibles de intervención terapéutica ("accionables"). Este es el caso, ya conocido del tumor miofibroblástico inflamatorio, que muestra reordenamientos de *ALK*, o de *ROS1* (Yamamoto et al, 2015).

Actualmente, las técnicas *gold standard* para la identificación de fusiones génicas son la RT-PCR y la hibridación fluorescente in situ (FISH) (Barr et al, 1995; Machado et al, 2009). La detección del transcrito de fusión mediante RT-PCR requiere conocer a priori los dos genes implicados en la fusión, para diseñar los *primers* correspondientes que amplifican un producto de PCR de tamaño determinado, que puede ser secuenciado (Sanger) posteriormente para

determinar el punto de rotura (Downing et al, 1993). En el FISH se utilizan sondas que cubren el punto de rotura de uno de los dos genes implicados en la translocación (Bridge et al, 2006) pero carece de resolución necesaria para la adecuada caracterización molecular de los genes de fusión, y la interpretación es difícil cuando las regiones reordenadas son cercanas o adyacentes (este es el caso en las fusiones *NAB2-STAT6*) (Mitelman et al, 2007). Además, ambas técnicas requieren tiempo y trabajo considerable, y no permiten realizar escrutinios de múltiples transcritos de fusión de forma simultánea cuando el diagnóstico es incierto (no se tiene certeza de qué gen de fusión podría estar implicado). Otro inconveniente frecuente es la escasez de material disponible para la realización estas determinaciones.

Las limitaciones de estas técnicas pueden superarse con la tecnología actual de secuenciación masiva o NGS (*Next Generation Sequencing*). La tecnología NGS permite la detección simultánea de varias fusiones génicas en una misma reacción con puntos de rotura variables. Las translocaciones pueden ocurrir en cualquier parte del genoma, incluyendo intrones y otros tipos de secuencia no codificante, y también en secuencia codificante de genes que pueden presentar diferentes grados de expresión. En el caso de genes con baja expresión las translocaciones darían lugar a genes quiméricos que carecerían de relevancia biológica. Existen dos metodologías para la detección de genes de fusión mediante NGS, según el material de partida para la preparación de las librerías, DNA o RNA. La búsqueda de reordenamientos utilizando DNA es más complicada, ya que para la captura de secuencias híbridas se requieren muchas más sondas que cubran amplias regiones intrónicas, que pueden ser repetitivas. Esto supone un encarecimiento de la técnica, más espacio en los equipos de secuenciación, y la necesidad de contar con más tejido tumoral para el análisis. En cambio, el RNA permite la detección de genes de fusión y determinar su grado de expresión (potencialmente oncogénicos) utilizando además muchas menos sondas, ya que durante el procesamiento del mRNA se maduran las secuencias intrónicas. Esto permite elevar el grado de *multiplexing* con menos material de partida. Existen muchos estudios en los últimos años que han empleado diferentes variantes de secuenciación de transcriptoma (RNA-Seq), en tumores más prevalentes, como los carcinomas de mama, pulmón y próstata, que han contribuido a la caracterización de cientos de fusiones génicas. El número de estudios de este tipo es menor en sarcomas, pero ya se han identificado 18 nuevos genes de fusión mediante RNA-Seq (Mertens & Tayebwa, 2014). Sin embargo, se estima que existe un gran número de genes de fusión por identificar. Por ejemplo, en tumores de partes blandas se han descrito unos 2280 cariotipos aberrantes, de los que 750 son translocaciones balanceadas (Mitelman et al, 2013). Además, los genes de fusión también pueden originarse a partir de reordenamientos no balanceados. Por lo tanto, estos datos citogenéticos indicarían efectivamente que deben existir muchos más genes de fusión que los descritos hasta la fecha.

La identificación de los transcritos de fusión con NGS se ha venido realizando mediante la aproximación de librerías de captura con *primers* opuestos (*paired-end sequencing*). Este sistema requiere conocer previamente los dos partners del gen de fusión, para diseñar *primers* específicos para cada uno de ellos. Tras la amplificación con estos *primers*, se realiza la ligación de adaptadores necesarios para la amplificación adicional y para el proceso de secuenciación. La empresa colaboradora (*ArcherDx*) ha desarrollado un sistema alternativo de enriquecimiento de la librería en los genes de interés, que incrementa la sensibilidad la detección de los transcritos de fusión mediante RNA-Seq. La principal ventaja del sistema, denominado *Anchored Multiplex PCR* (AMP, ver imagen en el Anexo), es que no se precisa conocer previamente los dos partners del gen de fusión. El sistema utiliza un *primer* específico unidireccional de uno de los genes implicados en la fusión, junto con un *primer reverse* que hibrida en una secuencia del adaptador (que se liga a los fragmentos antes de la amplificación). Con esta aproximación, las regiones de captura, conteniendo *partners* conocidos o no, se amplifican selectivamente. Esto aumenta la sensibilidad analítica del ensayo eliminando falsos negativos, que realmente podrían corresponder a variantes de la fusión no descritas previamente (*partner* nuevo). El análisis bioinformático posterior determina el segundo *partner* (conocido o no) de la fusión. Para utilizar de forma eficiente la capacidad *throughput* de los secuenciadores, se deben secuenciar varias muestras distintas de forma simultánea. Las diferentes muestras en el *pool* se identifican con una secuencia adaptadora que forma parte del MCB (*molecular barcode*) ligado a la secuencia de nucleótidos de interés durante la preparación de la librería, y que se leerán durante el subsiguiente proceso de secuenciación. Esta secuencia única para identificar a cada muestra en el *pool* recibe el nombre de *index*. El sistema de *ArcherDx* utiliza una combinación de dos índices para distinguir las distintas muestras. El primer índice se añade durante el paso de ligación del adaptador y está embebido en los adaptadores MBC. El segundo índice se incorpora en la segunda PCR. En consecuencia, se pueden discriminar las lecturas del secuenciador para las cadenas sentido y antisentido. Esto añade una ventaja adicional sobre el sistema tradicional de *paired-end sequencing* con el que se pierde la especificidad de cadena. Esto es importante en el caso del

análisis de muestras parafinadas. Durante el proceso de fijación de los tejidos con formalina se puede producir deaminación hidrolítica de las citosinas que pasan a uracilos. Esto resulta en artefactos del tipo C>T/G>A tras las amplificaciones de PCR, que con la química AMP pueden detectarse porque una de las cadenas conserva la G invariable y no se producen falsas llamadas SNV.

La tecnología descrita constituye una innovación muy significativa, que resuelve de forma muy eficiente el reto de la detección de genes de fusión mediante NGS, con un alto grado de potencial aplicación a la práctica clínica para el diagnóstico diferencial de los sarcomas. Creemos que dicha tecnología necesita ser validada clínicamente, y necesitamos hacerlo especialmente en el ámbito clínico de las entidades a las que hacemos referencia en los primeros párrafos de esta sección. Para ello será necesario adaptar la técnica a la resolución de los problemas concretos que planteamos, pero esto servirá de punto de partida para su aplicación rutinaria también en tumores más prevalentes. Debemos asimismo destacar que el componente de *discovery* asociado a la aplicación de esta técnica, repercutirá en la profundización sobre la caracterización molecular de entidades raras poco estudiadas. Esta propuesta incluye muestras de pacientes de cinco cohortes prospectivas diferentes de sendos ensayos clínicos de Grupo español de Investigación en sarcomas (GEIS) en las que creemos que la tecnología descrita, ligeramente adaptada, podría ser muy eficiente para el diagnóstico e individualización terapéutica de los sarcomas.



Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Citar las referencias incluidas en el apartado anterior: Antecedentes y Estado actual del Tema.

Máximo 1 página

Barr FG, Chatten J, D'Cruz CM, Wilson AE, Nauta LE, Nycum LM, Biegel JA, Womer RB (1995) Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *JAMA* **273**: 553-557

Bridge RS, Rajaram V, Dehner LP, Pfeifer JD, Perry A (2006) Molecular diagnosis of Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of two FISH strategies and RT-PCR in malignant round cell tumors. *Mod Pathol* **19**: 1-8

Deel MD, Li JJ, Crose LE, Linardic CM (2015) A Review: Molecular Aberrations within Hippo Signaling in Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Front Oncol* **5**: 190

Downing JR, Head DR, Parham DM, Douglass EC, Hulshof MG, Link MP, Motroni TA, Grier HE, Curcio-Brint AM, Shapiro DN (1993) Detection of the (11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol* **143**: 1294-1300

Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F eds (2013) WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone.

Grosso F, Jones RL, Demetri GD, Judson IR, Blay JY, Le Cesne A, Sanfilippo R, Casieri P, Collini P, Dileo P, Spreafico C, Stacchiotti S, Tamborini E, Tercero JC, Jimeno J, D'Incalci M, Gronchi A, Fletcher JA, Pilotti S, Casali PG (2007) Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *Lancet Oncol* **8**: 595-602

Machado I, Noguera R, Pellin A, Lopez-Guerrero JA, Piqueras M, Navarro S, Llombart-Bosch A (2009) Molecular diagnosis of Ewing sarcoma family of tumors: a comparative analysis of 560 cases with FISH and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* **18**: 189-199

Mertens F, Tayebwa J (2014) Evolving techniques for gene fusion detection in soft tissue tumours. *Histopathology* **64**: 151-162

Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* **7**: 233-245

Mitelman F, Johansson B, Mertens F eds (2013) Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

Smith SM, Coleman J, Bridge JA, Iwenofu OH (2015) Molecular diagnostics in soft tissue sarcomas and gastrointestinal stromal tumors. *J Surg Oncol* **111**: 520-531

Yamamoto H, Yoshida A, Taguchi K, Kohashi K, Hatanaka Y, Yamashita A, Mori D, Oda Y (2015) ALK, ROS1 and NTRK3 gene rearrangements in inflammatory myofibroblastic tumors. *Histopathology*

Expediente Nº

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN OBJETIVOS

(Ajústese al espacio disponible)

1. Diseño y validación clínica de sistemas de captura NGS de fusiones génicas como herramienta diagnóstica. Queremos identificar de manera simultánea todas las fusiones génicas presentes en muestras de sarcomas incluidos en parafina (el material clínico de rutina). Para la validación realizaremos las comparaciones pertinentes con las técnicas de rutina, FISH y RT-PCR (seguida de secuenciación Sanger), evaluando especificidad y sensibilidad. También determinaremos el tiempo de demora diagnóstica y la cantidad necesaria de material de biopsia para llegar a un diagnóstico molecular. Todas las determinaciones NGS se llevarán a cabo utilizando el nuevo sistema de librerías (*FusionPlex*) desarrollado recientemente por la compañía **ArcherDX, Inc.** (Boulder, CO, USA). El sistema de captura está diseñado para un panel concreto de genes que modificaremos para adaptarlo a loci específicos (ver a continuación). En este apartado el estudio estudio se centrará de manera especial en **120 casos** distribuidos en tres cohortes de pacientes, cada uno de ellos con clara aplicabilidad clínica, tomados de sendos ensayos clínicos del Grupo Español de Investigación en sarcomas (GEIS) con consentimiento informado de los pacientes:

- Se seleccionarán **30 pacientes** cuyo tumor muestre una morfología compatible con sarcoma Ewing-like (*BCOR-CCNB3*; *CIC-DUX4*). En estos casos se realizará en primer lugar un estudio con sondas no comerciales de FISH para reordenamientos de *BCOR* y de *CIC*, respectivamente, diseñadas y validadas en nuestro laboratorio en 2015. Los casos se obtendrán del estudio europeo EuroEwing-EEC (GEIS-34) del que nuestro grupo coordina a nivel nacional la confirmación diagnóstica centralizada. En este caso modificaremos el panel *FusionPlex* para incluir *BCOR* en lugar de *CCNB3* para poder comparar los resultados con los obtenidos con la sonda de FISH para *BCOR*.

- Se estudiarán también **50 pacientes** con tumor fibroso solitario, especialmente de sus variantes maligna y desdiferenciada. En primer lugar realizaremos técnica de FISH usando una sonda no comercial para reordenamientos de *STAT6* que hemos validado y patentado previamente (Nº registro: P201531898). Los pacientes se obtendrán del ensayo clínico GEIS-32 (*Ensayo clínico abierto fase II con Pazopanib administrado en solitario en pacientes con tumor fibroso solitario (TFS), no operables o metastásico, o pacientes con condrosarcoma mixoide extraesquelético*), de cuyo diagnóstico anatomopatológico somos revisores centrales. Se modificará el panel *FusionPlex* para asegurarnos que se pueden estudiar todas las posibles variantes de fusiones génicas *NAB2-STAT6*. Esto permitirá determinar asociaciones entre el tipo de fusión detectada y la respuesta al tratamiento administrado en el ensayo clínico.

- En tercer lugar seleccionaremos **40 pacientes** con liposarcoma mixoide. Veinte de ellos son de grado 1 o 2 de la FNCLCC, sin componente de células redondas, y se obtendrán de la cohorte B del ensayo internacional GEIS-37 (*Phase I-II prospective trial, multicenter, open label, exploring the combination of Trabectedin plus RAdiotherapy in Soft Tissue Sarcoma patients TRASTS*), coordinado desde nuestro centro. Otros 20 son de alto grado (3 de la FNCLCC, con >5% de células redondas) y se seleccionarán a partir del grupo 2 del ensayo GEIS-25 (*Sarcomas de partes blandas localizados de alto riesgo de extremidades y pared de tronco en adultos: un enfoque integrador que incluye quimioterapia estándar vs histotipo-dirigida neoadyuvante. Estudio colaborativo con el Grupo Italiano de Sarcomas (ISG)*). Se modificará el panel *FusionPlex* añadiendo el gen *CHOP (DDIT3)* para asegurarnos que se pueden estudiar todas las variantes de fusiones génicas *FUS/EWS-CHOP*. Esto permitirá determinar asociaciones entre el tipo de fusión detectada y la respuesta al tratamiento con Trabectedina/quimioterapia estándar administrado en el ensayo clínico.

2. Paralelamente, los análisis NGS permitirán además la identificación de nuevos genes de fusión, contribuyendo así a la caracterización molecular de entidades poco frecuentes que hasta ahora se consideran t-negativas (sin translocación). Inicialmente enfocaremos esta apartado al estudio de una serie de **40 pacientes** de sarcoma pleomórfico indiferenciado. La detección de nuevas fusiones génicas en este grupo tumoral permitirá una clasificación más precisa y una más clara orientación a las terapias dirigidas. En concreto nos centraremos en pacientes del previamente comentado ensayo clínico GEIS-25. Muchos de ellos corresponden a sarcomas pleomórficos indiferenciados. Determinaremos la presencia de fusiones génicas y validaremos aquellas que correspondan a mutaciones "accionables" (aquellas susceptibles de ser dianas terapéuticas farmacológicas; en sarcomas contamos con ejemplos en los que se incluyen *ALK1* o *ROS1*) mediante inmunohistoquímica/FISH en matrices tisulares.

*Adicionalmente, prevemos incluir unos **55 casos** de las demás entidades relevantes (alrededor de 11) representadas en el panel, seleccionando entre 3 y 6 casos de cada entidad. Considerando todos los apartados estimamos que analizaremos en **total 215 muestras** de tumores incluidos en parafina.

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN PROYECTOS COORDINADOS

En caso de Proyectos Coordinados, el COORDINADOR deberá indicar:

- Objetivos globales del proyecto coordinado, la necesidad de dicha coordinación y el valor añadido que se espera obtener de la misma.
- Objetivos específicos de cada subproyecto (deben estar recogidos además en la memoria de cada subproyecto)
- Interacción entre los distintos objetivos, actividades y subproyectos.
- Mecanismos de coordinación previstos para la eficaz ejecución del proyecto. **Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)**

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN PLAN DE TRABAJO

Etapas de desarrollo y distribución de las tareas de todo el equipo investigador.
Indicar además el lugar/centro de realización del proyecto.

(Ajustese al espacio disponible)

Selección de los casos para el estudio: La revisión de los especímenes a incluir en el estudio la llevarán a cabo los patólogos EDA, DM y GC (UGC Anatomía Patológica, HUVR). La información de los pacientes correspondientes, incluidos en los ensayos clínicos GEIS-25, GEIS-32, GEIS 34-, GEIS-37 (ver detalles en sección 'objetivos'), será recabada por los oncólogos JM, y CM (UGC Oncología Integral y Oncología Pediátrica-HUVR).

Diseño de sondas adicionales para la librería de fusiones: Modificaremos el panel *FusionPlex* para incorporar nuevos ensayos con los que crear una librería enriquecida en nuestros genes de interés adicionales. Para ello utilizaremos el software que proporciona la empresa colaboradora, con el que es posible diseñar los primers específicos identificando previamente los transcritos y los exones diana. El software selecciona los primers con el rango óptimo de temperatura de *melting* y con la mínima posibilidad de hibridación inespecífica. También se comprobará que el *coverage* de los ensayos diseñados es el apropiado, y que no interfieren con el resto de ensayos incluidos en el panel (JDM, MB, IBIS).

Preparación de RNA a partir de muestras de tejidos parafinados, y de tejido congelado: Para la preparación del RNA a partir de muestras parafinadas utilizaremos la solución el kit Qiagen® AllPrep DNA/RNA FFPE kit (80234) junto con la solución de desparafinación, siguiendo el protocolo de extracción que no incluye los sRNAs. La elución final se realizará con soluciones sin EDTA, y para reducir el *crosslinking* trataremos a 80°C durante 1h (AMB, MJH, MD, HUVR-IBIS).

Preparación de TMAs (*Tissue MicroArrays*) de los casos seleccionados (agrupados por entidades) que se utilizarán en las determinaciones FISH (MJH, AMB, UGC Anatomía Patológica, HUVR)

Ensayos de FISH/RT-PCR de los mismos casos analizados mediante NGS MB, AMB, MJH, MD (UGC Anatomía Patológica, HUVR).

Periodo formativo con la empresa colaboradora: Con el objeto de adquirir la formación adecuada, prevemos un periodo de formación con los especialistas de producto de la empresa colaboradora. Dicha formación incluirá el entrenamiento en la preparación de las librerías y en el análisis bioinformático específicamente dirigido a la interpretación de los datos de secuenciación para la identificación de genes de fusión (JDM, MB, HUVR-IBIS).

Preparación de librerías enriquecidas en los genes diana de interés: Seguiremos el protocolo indicado por la empresa colaboradora. En primer lugar se realizará una reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA utilizando *random hexamers* a partir 20 a 200 ng de RNA. El cDNA sintetizado en la reacción de retrotranscripción contendrá sitios de inicio al azar que aseguran la representación de todos los mRNAs. Una vez obtenida la primera cadena de cDNA realizaremos un ensayo previo de control de calidad (*PreSeq RNA QC Assay*), que anticipará si la muestra rendirá buenos resultados en el proceso de secuenciación. El ensayo mide la cantidad de RNA amplificable con longitud suficiente para permitir que se realicen *callings* fiables de los genes de fusión. El ensayo consistirá en una qPCR (SylverGreen) con la que determinaremos empíricamente el umbral necesario para el panel. En principio consideraremos que los valores de Ct mayores de 30 ciclos descartarían la muestra para los análisis ulteriores, mientras que los valores de Ct por debajo de 28.5 serán indicativos de que se obtendrán lecturas de secuencia de buena calidad. (JDM, MB, MD, HUVR-IBIS)

Secuenciación en equipos Illumina (MiniSeq) y análisis de datos NGS. Para mantener una profundidad de lectura adecuada, debe determinarse qué número de muestras pueden correrse juntas en una única *flow cell* (asumiendo p.ej. 25 millones de lecturas por carrera si se usan los reactivos para *MiniSeq*). En general, cuanto más dianas contenga el panel, la profundidad de secuenciación necesaria será mayor y por tanto deberían correrse menos muestras. Como punto de partida, estimamos que el tamaño de nuestro panel para sarcomas podría contener unos 148 ensayos para 26 genes, que requerirían entre 1 y 1,5 millones de lecturas por muestra, permitiendo la secuenciación conjunta de entre 8-16 muestras. JDM, MB (UGC Anatomía Patológica -IBIS)

Análisis estadísticos: Comprobaremos la correlación entre los resultados de los ensayos FISH/RT-PCR y los datos de NGS mediante el coeficiente *kappa*, que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia o grado de acuerdo observada para los elementos cualitativos. También evaluaremos la sensibilidad y especificidad de cada técnica mediante curvas ROC (EDA, JM, CM, JDM, MB, UGC Anatomía Patológica-HUVR).

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN PLAN DE TRABAJO
(Ajustese al espacio disponible. Puede incorporar hasta un máximo de 8 líneas de Actividad/Tarea)

CRONOGRAMA

ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Selección de los casos para el estudio.	EDA, DM, GC, JM CM	1º Año	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		2º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preparación de RNA de tejido FFPE o congelado y test de calidad	MJH, AMB, MD	1º Año	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		2º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preparación TMAs. Determinaciones FISH y RT-PCR	MJH, AMB, MD, MB	1º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
		2º Año	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Formación por especialistas de la empresa. Diseño de sondas adicionales para panel	JDM, MB	1º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		2º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preparación de librerías enriquecidas en los genes diana de interés.	JDM, MB, MD	1º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
		2º Año	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cuantificación de las librerías y optimización de profundidad de lectura. Secuenciación	JDM, MB, MD	1º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
		2º Año	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Análisis de datos NGS y correlación con FISH/RT-PCR (sensibilidad, especificidad).	EDA, JDM, MB, JM, CM	1º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		2º Año	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN PLAN DE TRABAJO

Inserte (si lo desea) una imagen con un cronograma.

Máximo un fichero de imagen formato jpg

Empty box for inserting a Gantt chart image.

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

**MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN EXPERIENCIA DEL EQUIPO**

Experiencia del equipo investigador sobre el tema y experiencia previa de transferencia.

(Ajústese al espacio disponible)

El principal interés del grupo del Dr. Enrique de Álava (Director UGC Anatomía Patológica HUVR; Presidente, Sociedad Española de Anatomía Patológica) es la patología molecular de los sarcomas de hueso y partes blandas. Su grupo forma parte de EuroBoNet (FP6 European Research Network on Bone Tumors), donde Enrique de Álava coordina los esfuerzos en la biología del SE, proteómica e inmunohistoquímica. Su grupo también participa en Eurosarc, un proyecto cooperativo (FP7) que engloba ocho ensayos clínicos diferentes en sarcoma, y que constituye el componente traslacional de los resultados obtenidos en EuroBoNet. El grupo participa en el protocolo europeo EuroEwing, que recientemente ha sido financiado dentro del FP7. También participa en PROVABES, donde coordina el WP de validación prospectiva de alteraciones de número de copia génica en sarcoma de Ewing. Enrique de Álava encabeza uno de los laboratorios líderes en el diagnóstico molecular de sarcomas en España, y coordina la Red Nacional de Biobancos. Enrique de Álava pertenece al panel WHO para la clasificación de tumores de hueso y partes blandas (2013), coordinando todos los esfuerzos en el SE. Su grupo ha sido incorporado regularmente a las sucesivas redes de investigación en cáncer (RITSI, RTICC), siempre trabajando en el programa de tumores sólidos pediátricos. Su grupo de investigación se ha transferido al HUVR-IBiS en el verano de 2013. Durante los últimos 10 años sus resultados se han publicado en 38 artículos centrados específicamente en este tumor, 34 de ellos en el Q1 de sus áreas de conocimiento, muchos de ellos en colaboraciones nacionales e internacionales. En ellos destaca el trabajo de establecer las ganancias de 1q como factor pronóstico adverso en sarcoma de Ewing así como las dianas terapéuticas derivadas de este evento (Oncogene 2013;32:1441-51, Oncogene 2012;31:1287-98), así como la caracterización y aplicación terapéutica de la señalización de IGF1R (Amaral et al., Clin Canc Res 2014 aceptado; PLoS One 2011;6(5):e19846; Cancer Res 2008;68:6260-70). El grupo participa de consorcios nacionales tales como la RTIC de cáncer o el Grupo español de Investigación en sarcomas (GEIS).

Nuestro grupo cuenta con cuatro patentes, recogidas en los CVN de los investigadores. Todas ellas han sido fruto de la búsqueda, validación y aplicación a la clínica de biomarcadores diagnósticos, pronósticos o predictivos en sarcomas pediátricos. De especial relevancia para esta propuesta es la patente P201531898, "*Diagnóstico del cáncer de tejidos blandos*", en la que se protege el diseño de una sonda de FISH útil para el diagnóstico de los reordenamientos génicos del gen *STAT6* del tumor fibroso solitario, uno de los tumores incluidos en la propuesta, y que va a ser el comparador diagnóstico, para este tipo tumoral con la tecnología de NGS que vamos a evaluar en esta propuesta.

Por otra parte el equipo investigador, notablemente diversificado tras el traslado del grupo de investigación al HUVR-IBiS, tiene un elevado grado de especialización científico-tecnológica, articulando coherentemente en nuestro ámbito local un grupo multidisciplinar y multicéntrico. El grupo cuenta con personal con actividad asistencial en sarcomas (anatomopatólogos, biólogos moleculares) y personal investigador centrado en los mecanismos de sarcomagénesis y señalización en sarcomas. Por otro lado es un equipo multicéntrico, esto se deriva de la pertenencia del grupo a un Instituto de Investigación Sanitaria del ISCIII, el IBiS, que asegura el carácter traslacional de la investigación realizada en el campus Hospital Universitario Virgen del Rocío-IBiS. En concreto el equipo integra tres anatomopatólogos con actividad diagnóstica en sarcomas en el complejo HUVR (David Marcilla, Enrique de Álava, Gema Civantos), el responsable del laboratorio de patología molecular diagnóstica en Anatomía Patológica HUVR (Michele Biscuola), tres técnicos de la UGC Anatomía Patológica (Ángela M^a Blanco, M^a José Hernández Barrera, Mercedes Delgado), y un investigador postdoctoral (Juan Díaz Martín). Destacamos en el equipo investigador a la Dra. Catalina Márquez, oncóloga pediátrica del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Ella es la coordinadora del CSUR sobre sarcomas infantiles del HUVR-HUVM y es la IP en nuestro centro del ensayo EuroEwing-EEC, cuyas muestras serán objeto de estudio en la propuesta. Otro componente clave del grupo que envía esta propuesta es el Dr. Javier Martín, oncólogo médico del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Es el Presidente del Grupo Español de Investigación en sarcomas desde 2009. En nuestro centro es el IP de los ensayos GEIS-25, GEIS-32 y GEIS-37, relevantes para esta propuesta. El Dr. Martín coordina en nuestro centro el proyecto de acreditación de CSUR de sarcomas de adultos, que está en estos momentos en el proceso de evaluación final como CSUR.

Expediente Nº

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN IMPACTO

(Ajustese al espacio disponible)

1. Impacto económico.
2. Impacto en el desarrollo tecnológico del Sistema Territorial de Salud.
3. Impacto en la cohesión territorial del SNS.

1. Impacto económico.

Creemos que este proyecto supondrá la introducción en el SNS de una tecnología que creemos cuenta con una mayor eficiencia que la actual, con un consumo de recursos similar o inferior al actual. El coste de una técnica de FISH para detectar translocaciones es aproximadamente 125€/muestra. Eso no incluye el coste del tiempo de personal facultativo que debe interpretar cada caso, que supone cerca de una hora. El estudio de un caso de sarcoma mediante FISH se da habitualmente en el seno de un diagnóstico diferencial que incluye dos o más entidades. Ello requiere la realización de una hibridación con una sonda adicional en aproximadamente un 20% de casos. El coste del estudio de una muestra con la tecnología propuesta es de aproximadamente 350€. Sin embargo ese coste incluye el estudio de más de 25 genes implicados en reordenamientos de sarcomas. Dicho ensayo tiene la capacidad de identificar cualquier *partner* (conocido o no) en la fusión, lo que eleva a un grado altísimo la combinatoria de genes de fusión detectables. Esto soluciona en una única determinación todo el diagnóstico diferencial del caso, con las ventajas añadidas de un menor tiempo de interpretación por el facultativo, y consumiendo una cantidad menor de muestra tumoral.

Por otra parte el desarrollo de este proyecto puede suponer un impacto sensible en la transferencia al sector productivo. Creemos que las modificaciones propuestas sobre la tecnología base de ArcherDX (FusionPLex Sarcoma) pueden ser protegibles y explotables de común acuerdo con la empresa ArcherDx. Además, como se describe en las Secciones Antecedentes y Objetivos, es muy probable que durante el desarrollo del proyecto identifiquemos nuevos genes de fusión, para los que se podrían diseñar ensayos más específicos susceptibles asimismo de ser protegibles.

2. Impacto en el desarrollo tecnológico del Sistema Territorial de Salud.

Este proyecto se enmarca en la innovación en salud y bienestar social descrita en la Estrategia de Investigación e Innovación (I+i) 2014-2018 de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, sobre todo en su OBJETIVO 4: "*Promover un modelo de investigación clínica más sostenible, orientada a la transferencia efectiva de resultados a la industria y al ámbito socio-sanitario*". El proyecto tendrá impacto significativo en la calidad de la información que se genere para ensayos clínicos y proyectos de investigación para poder facilitar la exportación de datos al Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz (SSPA). Además supondrá una innovación tecnológica considerable (introducción de técnicas de NGS) en una enfermedad poco prevalente como los sarcomas y para el único centro del Servicio Andaluz de Salud designado como CSUR (Centros, servicios y unidades de referencia del SNS) para sarcomas infantiles, y que está en el proceso de selección final como CSUR para sarcomas de adultos. Las aplicación de técnicas NGS para la detección de variantes somáticas en oncología se viene implementando de forma creciente en los últimos años. Sin embargo, la detección de genes de fusión mediante NGS supone una complejidad adicional de la técnica que no se ha resuelto satisfactoriamente hasta los últimos uno o dos años. La implementación en la práctica clínica de este método supondría una acción con un fuerte componente innovador incluso a nivel europeo, que tendría la citada derivada de ampliar del espectro de aberraciones moleculares en sarcomas, pero también en tumores más prevalentes. De este modo, si esta tecnología se valida clínicamente para los sarcomas infantiles o de adultos, es muy probable que sea también de interés para su uso en el diagnóstico de tumores más prevalentes con translocaciones (próstata, pulmón, tiroides, riñón, o sistema nervioso central).

El proyecto va dirigido de lleno a la línea de investigación prioritaria en "*Tecnologías moleculares y celulares de aplicación a las intervenciones sobre la salud humana*", en su apartado 2, "*Mejoras en los procesos de predicción, diagnóstico y seguimiento de enfermedades y monitorización de la respuesta terapéutica*", de la convocatoria de la AES 2016.

3. Impacto en la cohesión territorial del SNS.

La filosofía del CSUR es la de ser referencia para el manejo clínico de enfermedades, como por ejemplo los sarcomas, que incluyen pruebas diagnósticas, terapias adyuvantes, tratamiento quirúrgico y análisis de los especímenes resecados que deben ser llevados a cabo por un grupo multidisciplinar de profesionales con formación específica en este tipo de lesiones. La introducción y validación de la tecnología propuesta, seguida de su inclusión en cartera de servicios y en las guías de práctica clínica correspondientes, se podrá extender, con el impulso de las sociedades científicas correspondientes, a los demás CSUR españoles de sarcomas (adultos e infantiles) y por tanto, en caso de demostrarse su eficiencia, rápidamente a todo el Sistema Nacional de Salud.

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN MEDIOS DISPONIBLES

(Ajustese al espacio disponible)

Medios disponibles para la realización del proyecto

El Laboratorio de Patología Molecular de la UGC de Anatomía Patológica (HUVR) cuenta con una habitación de aproximadamente 40m², junto con la posibilidad del uso compartido de otras dos habitaciones de 10m² pertenecientes a las instalaciones de la UGC de Anatomía Patológica. Cuenta con equipos específicos para la extracción y medición de ácidos nucleicos (QIACUBE, Espectrofotómetro Nanodrop), termocicladores para amplificación por PCR, PCR en Tiempo Real, equipo de pirosecuenciación [AB9700 y Gradient-PCR (Eppendorf); Rotor Gene Q (Qiagen); 7900 Fast PCR (AB); COBAS 4800 (Roche); PyroMark 24 (Qiagen)], dos equipos para la hibridación de ácidos nucleicos (Hibridizer de Dako y ThermoBrite de Abbott Molecular) y un equipo para la hibridación automatizada que se está terminando de poner a punto y validar (XmatrixNano), un microscopio de fluorescencia de Leica con 6 filtros distintos para estudio de fluoróforos de distintas longitud de onda (FITC, Gold, Aqua, FarRed, SpecRed, DAPI), sistemas de electroforesis (cubetas y fuentes de alimentación de corriente continua) y sistema de foto-documentación de geles. También dispone de los instrumentos necesarios para la construcción de las matrices de tejidos y para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos, que incluyen: TMA workstation (Beecher Instruments), y sistemas Autostainer Link 48 (DAKO) y DAKO OMNIS.

* El catálogo de sondas FISH disponibles (para determinación de translocaciones) en Laboratorio de Patología Molecular de la UGC de Anatomía Patológica se detalla en el Anexo.

Contamos con el apoyo del nodo del Biobanco del SSPA del HUVR, que se ubica físicamente en la UGC Anatomía Patológica.

En nuestro laboratorio en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) disponemos también de todo el pequeño aparataje necesario para el desarrollo del proyecto: Termocicladores (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), Multiskan Spectrum (Thermo Scientific), PCR a tiempo real (7900 HT, Applied Biosystems), microcentrífugas, vortex, etc...

Dentro de las instalaciones del IBiS disponemos de los demás instrumentos necesarios, integrados en los diferentes Servicios de Apoyo del instituto:

- Servicio de Citometría de Flujo y Separación Celular: Citómetros analizadores Cytomics FC500 (Coulter) y LRS II Fortessa (Becton Dickinson), Separador magnético automático AutoMACS ProSeparator (Miltenyi Biotec), Separador celular High Speed MoFlo Cell Sorter (Beckman Coulter).

- Servicio de Histología: Procesador Automático de Tejidos LEICA ASP300S, para la deshidratación e inclusión de tejidos en parafina. Microtomos monitorizados LEICA RM2255. Criostatos LEICA CM1950, para cortes por congelación. Vibratomos LEICA VT1000S.

- Servicio de Microscopía: Microscopios de fluorescencia directos, microscopios de fluorescencia invertidos, microscopios de fluorescencia directos con programa CAST GRID para estereología, disector por láser, cariotipador, Microscopios confocales de barrido por láser.

- Servicio de Cultivo de Tejidos, Células y otros Microorganismos patógenos: Disponemos de varios espacios para cultivo en los laboratorios de nivel de contención biológica 2 (NCB-2), y en el laboratorio de nivel de contención biológica 3 (NCB-3).

- Servicio de Genómica y Secuenciación: Bionalizador 2100 (Agilent), secuenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), Plataforma de espectrometría de masas MassArray MALDI-TOF (SEQUENOM), Plataforma GeneChip (Affymetrix).

- En el complejo HUVR existen equipos NGS de Illumina pero no son de acceso compartido, y no contamos con preferencia de uso para este equipamiento. Es por esto, que solicitamos en la sección de presupuesto la adquisición del equipo *MiniSeq Benchtop Sequencer* (Illumina®). El gran volumen de muestras a analizar hace imprescindible contar con un equipo propio de uso exclusivo, para que no se vea comprometida la consecución y el desarrollo del proyecto que solicitamos.

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN JUSTIFICACIÓN DETALLADA DE LAS PARTIDAS PRESUPUESTARIOS SOLICITADAS

(Ajustese al espacio disponible)

Nuestra previsión es analizar al menos 215 muestras de sarcomas, contabilizando tanto material retrospectivo como las muestras que se remitan a la UGC Anatomía Patológica-HUVR durante el desarrollo del proyecto en el seno de los ensayos clínicos mencionados en las secciones previas. La revisión histopatológica de las muestras constituye el primer filtrado para la selección de aquellas que correspondan a entidades con translocaciones asociadas.

-Servicio de transacción de biorrecursos por el nodo del Biobanco SSPA del HUVR: **1.000 EUR**

- Determinaciones FISH para 215 muestras en TMA: **4.000 EUR**

- Determinaciones RT-PCR y secuenciación Sanger para 215 muestras: **3.500 EUR**

Diseñaremos las sondas necesarias para comprobar los hallazgos de NGS para las que no hay sonda FISH disponible. También realizaremos secuenciación Sanger de los productos de amplificación de las RT-PCR, para comprobar que el punto de empalme es el mismo en un evento concreto.

- Extracción RNA: Para la preparación del RNA a partir de muestras parafinadas utilizaremos el kit Qiagen® AllPrep DNA/RNA FFPE (80234) para 50 muestras
Precio 1U: 719 EUR. Para 200 muestras se requieren 4 kits: **2.876 EUR**

Secuenciación NGS:

Los paneles que diseñaremos contendrán entre 130 y 140 ensayos para 25-30 genes distintos. Esto requerirá una profundidad de lectura aproximadamente de 1,5 millones por muestra. Con el equipo MiniSeq se pueden obtener hasta 25 millones de lecturas.

- Equipo de secuenciación:

MiniSeq Benchtop Sequencer (#SY-420-1001, Illumina®): 50.180 EUR.

- Solicitamos también la realización de un contrato de mantenimiento del equipo, que cubre la asistencia técnica, actualizaciones, etc.:

Product Care MiniSeq Comprehensive Plan (#20004133): 5.658 EUR

- Reactivos preparación de librerías customizadas (con nuestros diseños a medida) y prediseñadas (Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Kit for Illumina®). El formato del kit es de 8 reacciones con un precio de \$2,390. Para 200 muestras: **60.000 EUR** aprox.

- Reactivos para las reacciones de secuenciación (Flow Cells):
MiniSeq High Output Kit (300 cycles) # FC-420-1003: 1472 EUR/unidad
Necesitaremos 20 unidades: **29.440 EUR**

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN PRESUPUESTO

Presupuesto solicitado

Gastos de Ejecución

A) Adquisición de bienes y contratación de servicios

(Bienes inventariables, material fungible y gastos complementarios)

Euros

Sondas y reactivos para FISH	4.000
Reactivos RT-PCR y secuenciación Sanger	3.500
Reactivos para extracción de RNA	2.876
Reactivos preparación de librerías (Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Kit for Illumina®)	60.000
MiniSeq Benchtop Sequencer (Illumina®) + Plan de Mantenimiento	55.838
Reactivos para las reacciones de secuenciación (Flow Cells)	29.440
Transacción biorrecursos Biobanco SSPA (nodo HUVR)	1.000

Subtotal Gastos Bienes y Servicios : 156.654

B) Gastos de Viajes

Desplazamientos para encuentros con la empresa colaboradora	4.500
---	-------

Subtotal Gastos Viajes : 4.500

Subtotal Gastos Ejecución : 161.154

Total Solicitado : 161.154

Total + 10% Costes Indirectos : 177.269,4

Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD
SECCIÓN ANEXOS

INTRODUZCA TEXTO COMO ANEXO

Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)

Catálogo de sondas FISH para detección de translocaciones en Sarcomas (UGC Anatomía Patológica-HUVR)

Sondas FISH	Entidades
ALK 2p23	Tumor miofibroblástico inflamatorio
DDIT3 [CHOP] 12q13.1	Liposarcoma mixoide
ETV6 12p13	Fibrosarcoma infantil
EWSR1 22q12.2	Sarcoma de célula clara, Sarcoma de Ewing, Sarcoma desmoplásico de célula redonda, Liposarcoma, Mioepitelioma, Condrosarcoma mixoide extraesquelético, Histiocitoma, fibroso angiomatoide
FOXO1 [FKHR] 13q14.1	Rabdomiosarcoma alveolar
FUS 16p11.2	Sarcoma fibromixoide de bajo grado, Fibrosarcoma epitelioidesclerosante, Liposarcoma, Histiocitoma fibroso angiomatoide
SS18 [SYT] 18q11.2	Sarcoma sinovial
TFE3 Xp11.23	PEComa, Tumor miofibroblástico inflamatorio, hemangioendotelioma epitelioides
BCOR Xp11.4	Sarcoma Ewing-like
CIC 19q13.2	Sarcoma Ewing-like
HMGA2 12q14.3	Lipomas, Tumores adipocíticos, Leiomioma del útero
STAT6 12q13	Tumor fibroso solitario
WWTR1 3q25.1	Hemangioendotelioma epitelioides
NR4A3 9q31.1	Condrosarcoma mixoide extraesquelético
JAZF1 7p15.2	Sarcoma del estroma endometrial
COL1A1/PDGFB 17q21.33-22q13.1	Dermatofibrosarcoma protuberans

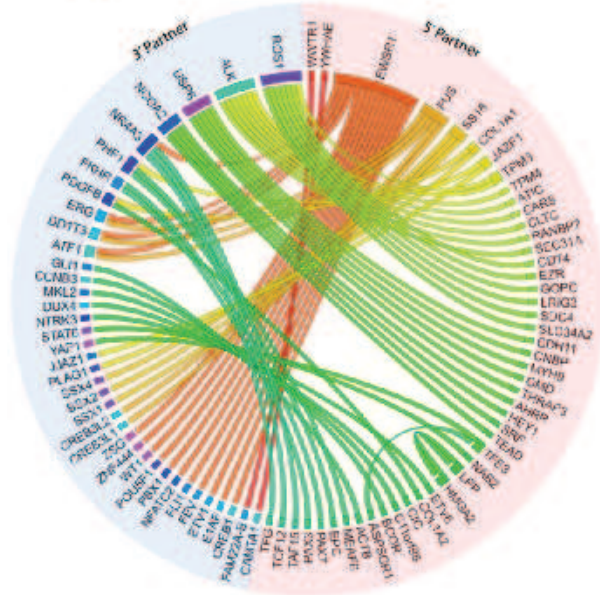
Expediente N°

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Enrique de Álava Casado

INTRODUZCA UNA IMAGEN COMO ANEXO

Máximo un fichero de imagen formato jpg

Mapa de Fusiones en Sarcomas



Detección de fusiones génicas con el sistema *Anchored Multiplex PCR*

