

# MEMORIA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

<b>TITULO DEL PROYECTO</b>	FONDO PABLO UGARTE PARA EL DESARROLLO DE TERAPIAS AVANZADAS EN SARCOMA DE EWING Y OTROS CÁNCERES INFANTILES
<b>INVESTIGADOR PRINCIPAL</b>	Javier Alonso, Ph. D. Investigador Científico OPIs
<b>CENTRO DE INVESTIGACIÓN</b>	Instituto de Salud Carlos III Instituto de Investigación de Enfermedades Raras Unidad de Tumores Sólidos Infantiles Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km 2 28045 Majadahonda, Madrid
<b>FECHA INICIO</b>	Junio 2018

## TÍTULO DEL PROYECTO

### FONDO PABLO UGARTE PARA EL DESARROLLO DE TERAPIAS AVANZADAS EN SARCOMA DE EWING Y OTROS CÁNCERES INFANTILES

## RESUMEN

El sarcoma de Ewing es un tumor muy agresivo que afecta a niños y adolescentes. En la actualidad, y a pesar de los intensos tratamientos que se aplican a estos pacientes, el 40% de ellos morirán como resultado de la enfermedad. Estas tasas de supervivencia han permanecido estancadas durante los últimos 25 años, por lo que se hace necesario desarrollar terapias vanguardistas (terapias avanzadas).

En este proyecto proponemos el desarrollo de una terapia génica para inactivar permanentemente el gen de fusión EWS-FLI1 característico del sarcoma de Ewing, considerado por todos los expertos como el primer y principal “driver” de este tipo de cáncer.

El objetivo final del proyecto es demostrar que este desarrollo tecnológico es factible, y así sentar las bases para el desarrollo de una terapia realmente vanguardista y novedosa para tratar a estos pacientes.

## SUMMARY

Ewing's sarcoma is a very aggressive tumor that affects children and adolescents. At present, and despite the intense treatments that are applied to these patients, 40% of them will die as a result of the disease. These survival rates have remained stagnant for the last 25 years, so it is necessary to develop cutting-edge therapies (advanced therapies).

In this project we propose the development of a gene therapy to permanently inactivate the EWS-FLI1 fusion gene characteristic of Ewing sarcoma, considered by all experts as the first and main driver of this type of cancer.

The final objective of the project is to demonstrate that this technological development is feasible, and thus provide the basis for the development of a truly avant-garde and novel therapy to treat these patients.

## INTRODUCCIÓN

El sarcoma de Ewing es un tumor muy agresivo que afecta a niños y adolescentes. La mayoría de los tumores se localizan en los huesos tubulares largos, como la tibia o el fémur, aunque el 10% de los tumores también pueden desarrollarse en los tejidos blandos. Histológicamente, el sarcoma de Ewing está formado por células pequeñas, con escaso citoplasma que no presentan signos de diferenciación, por lo que el diagnóstico diferencial en comparación con otras entidades de apariencia similar reviste cierta dificultad (Gaspar et al.)

La supervivencia global a los 5 años es aproximadamente del 65%, aunque este valor varía significativamente en función de la localización anatómica de los tumores primarios y la presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. Así, los pacientes con tumores primarios localizados en las extremidades y sin metástasis en el momento del diagnóstico tienen mejores tasas de supervivencia que los pacientes que presentan metástasis en el momento del diagnóstico o tumores primarios irreseccables localizados en el esqueleto axial (por ejemplo, pelvis o vértebras) (Gaspar et al.).

El tratamiento convencional consta de tres fases: i) una fase de inducción que consiste en ciclos de quimioterapia que combinan 3-4 citostáticos, ii) cirugía para eliminar el tumor y/o radioterapia local cuando la eliminación total del tumor no ha sido posible y iii) una fase de consolidación que consiste en una nueva ronda de quimioterapia. A pesar de estos tratamientos agresivos, alrededor del 40% de los pacientes morirán debido a la enfermedad, como consecuencia de tumores refractarios que no responden al tratamiento o la aparición de recidivas tardías, la mayoría de las veces con resultados fatales (Gaspar et al.). Las tasas de supervivencia han permanecido estancadas durante los últimos 25 años, y aunque la investigación básica y traslacional ha permitido la identificación de algunas dianas terapéuticas prometedoras (como por ejemplo, la vía del IGF-1), ninguna de las terapias dirigidas evaluadas hasta la fecha ha tenido un éxito destacable. Por lo tanto, es urgente desarrollar terapias realmente novedosas e innovadoras (es decir, terapias avanzadas) que representen un avance real en el tratamiento de este tipo de cáncer (Kovar et al., 2016; Kovar 2014).

La principal característica molecular del sarcoma de Ewing es la presencia de translocaciones cromosómicas específicas de este tumor. La translocación más frecuente, presente en el 85% de los casos, es la t(11; 22). Hoy en día está totalmente aceptado que esta alteración cromosómica es el primer evento molecular que ocurre en estos tumores y por lo tanto se considera la principal mutación “driver” en este cáncer. Esta translocación cromosómica y otros equivalentes dan lugar a proteínas de fusión quiméricas que en el caso de la t(11; 22) da lugar a la fusión de los genes EWS y FLI1. El gen FLI1 es un factor de transcripción, por lo que la nueva proteína quimérica da lugar a un nuevo factor de transcripción, llamado EWS-FLI1 con propiedades diferentes del FLI1 nativo (Ordoñez et al.). Este factor de transcripción aberrante rige la expresión de una serie de genes que posteriormente regulan la proliferación celular y la diferenciación celular, produciendo un crecimiento descontrolado que da lugar al tumor. Una de las principales líneas de investigación de

nuestro grupo es la identificación de los genes diana de EWS-FLI1 y el estudio de su papel funcional en el desarrollo del tumor, con el objeto de comprender mejor las bases moleculares de esta enfermedad (Cidre-Aranaz et al., 2017; Cidre-Aranaz et al., 2015; Agra et al., Navarro et al., García Aragoncillo et al., Carrillo et al.)

Un gran número de estudios independientes han demostrado que la expresión de EWS-FLI1 es absolutamente necesaria para la proliferación de las células tumorales (Kovar 2014). Así, la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 bloquea la proliferación celular e inhibe el crecimiento tumoral, lo que demuestra que estos tumores son dependientes de esta proteína quimérica oncogénica. Por lo tanto, resulta evidente que un medicamento dirigido contra la actividad de la proteína quimérica EWS-FLI1 debería ser una de las estrategias más efectivas para combatir este tumor. Sin embargo, y aunque se han desarrollado algunas moléculas capaces de inhibir la actividad transcripcional de EWS-FLI1, su eficacia es baja, probablemente debido a la dificultad de inhibir la actividad intrínseca de los factores de transcripción (Kovar et al., 2016). Por otro lado, estos inhibidores de EWS-FLI1 deberían administrarse de forma crónica, con los problemas asociados de resistencia a largo plazo y toxicidades que esto puede implicar.

Recientemente, ha surgido una nueva técnica de edición de genes que ha abierto una amplia gama de posibilidades para el tratamiento de enfermedades genéticas. La técnica se basa en el sistema CRISPR / Cas9, un mecanismo natural de defensa de ciertos tipos de bacterias contra la infección por virus (Mojica et al.). El desarrollo tecnológico asociado a esta técnica en los últimos 5 años ha sido extraordinario, lo que explica las posibilidades que ofrece esta tecnología en el campo de la investigación biomédica, y sobre todo en el campo de la terapia génica y el desarrollo de terapias avanzadas para el tratamiento de enfermedades. El sistema CRISPR / Cas9 permite editar el genoma a voluntad. Con esta técnica es posible introducir mutaciones, reparar mutaciones existentes, provocar grandes deleciones, reordenamientos cromosómicos o cualquier otra alteración a nivel genético o genómico. Por lo tanto, es una técnica muy versátil que abre un nuevo mundo en el área de la terapia génica (Hsu et al., Komor et al., Liang et al., Torres-Ruiz et al., Xiao et al.). Esta técnica ofrece un enorme abanico de posibilidades para el tratamiento de enfermedades monogénicas mediante la reversión de las mutaciones asociadas, particularmente en el campo de las enfermedades hematológicas. Por el contrario, es poco probable que esta tecnología pueda ser útil para el tratamiento de la mayoría de los cánceres, ya que sería necesario corregir las docenas de mutaciones oncogénicas existentes en la mayoría de los tumores para revertir el fenotipo tumoral (Sánchez -Rivera et al.). Sin embargo, esta técnica de edición de genes puede ser muy útil en tumores caracterizados por una baja tasa de mutaciones y particularmente en aquellos caracterizados por la existencia de un único evento oncogénico inicial responsable del desencadenamiento del proceso tumoral (Jubair et al.), como es el caso del sarcoma de Ewing. En este proyecto, proponemos evaluar varias alternativas para desactivar permanentemente el oncogén EWS-FLI1 utilizando el sistema CRISPR/Cas9.

Uno de los problemas asociados a la terapia génica es la forma en la que esta se administra al organismo. Una terapia de edición genética destinada a inactivar permanentemente el gen de fusión EWS-FLI1 debe administrarse sistémicamente para llegar idealmente a las células tumorales presentes en el cuerpo del paciente. La administración sistémica implica riesgos importantes, por lo que la terapia debe ser lo suficientemente específica como para no afectar a las células normales y, en particular, a las células germinales y además debe ser poco inmunogénica. En los últimos años se están desarrollando numerosas estrategias para transportar la maquinaria de editado génico a las células diana (Lino et al., 2018). Cada una de ellas tiene sus ventajas e inconvenientes y en la actualidad no existe una tecnología que haya mostrado ser claramente superior. En este proyecto proponemos analizar varias de estas tecnologías para identificar la que mejor se puede adaptar a las características específicas de la enfermedad.

En resumen, en este proyecto proponemos el desarrollo de una terapia génica para inactivar permanentemente el gen de fusión EWS-FLI1 en células de sarcoma de Ewing utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 y diferentes estrategias para transportar *in vivo* la maquinaria de editado a las células diana. La inactivación permanente de este oncogén mediante esta aproximación terapéutica inhibirá la proliferación celular y provocará la desaparición del tumor. El objetivo final del proyecto es demostrar que este desarrollo tecnológico es factible, y sentar las bases para el desarrollo de una terapia realmente vanguardista y absolutamente diferente para tratar a estos pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agra et al. Lysyl oxidase is downregulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and its propeptide domain displays tumor suppressor activities in ewing sarcoma cells. *PLoS One* 2013;10.1371/journal.pone.0066281
- Carrillo et al. Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth *Clin. Cancer Res.* 2007;13:2429-2440
- Cidre-Aranaz et al. EWS-FLI1-mediated suppression of the RAS-antagonist Sprouty 1 (SPRY1) confers aggressiveness to Ewing sarcoma. *Oncogene* 2017;36(6):766-776
- Cidre-Aranaz et al., EWS/FLI1 Target Genes and Therapeutic Opportunities in Ewing Sarcoma. *Front Oncol.* 2015;5:162
- Eid et al. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med.* 2016;48(10):e265
- Gaspar et al. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):3036-3046
- García-Aragoncillo et al. DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell cycle progression in Ewing tumors. *Oncogene* 2008;27:6034-6043
- Hsu et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;157:1262-1278.
- Jubair et al. The Therapeutic Potential of CRISPR/Cas9 Systems in Oncogene-Addicted Cancer Types: Virally Driven Cancers as a Model System. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017;8:56-63
- Kovar. Blocking the road, stopping the engine or killing the driver? Advances in targeting EWS/FLI-1 fusion in Ewing sarcoma as novel therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18(11):1315-28.
- Kovar et al. The second European interdisciplinary Ewing sarcoma research summit--A joint effort to deconstructing the multiple layers of a complex disease. *Oncotarget.* 2016;7(8):8613-8624
- Komor et al. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell.* 2017;168(1-2):20-36
- Liang et al. Developmental history and application of CRISPR in human disease. *J Gene Med.* 2017; doi: 10.1002/jgm.2963
- Lino et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery.* 2018, 25:1234-1257
- Mojica et al. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol.* 2016;24(10):811-820.
- Navarro et al. The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes  $\beta$ -catenin/TCF-mediated transcription. *Carcinogenesis* 2010;3:394-401
- Ordóñez et al. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead?. *Cancer Res.* 2009;69(18):7140-7150
- Sánchez-Rivera et al. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer.* 2015;15:387-395.
- Torres-Ruiz et al. CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. *Brief Funct Genomics.* 2017;16(1):4-12
- Xiao-Jie et al. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet.* 2015;52(5):289-96

## OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

### **OBJETIVO 1. Determinar la estrategia óptima para inactivar permanentemente el oncogén EWS-FLI1 utilizando la tecnología CRISPR / Cas9.**

Uno de los aspectos claves del proyecto será identificar la mejor estrategia para inactivar de forma permanente el oncogén EWS-FLI1. Para ello se analizarán diferentes estrategias en diferentes líneas celulares derivadas de sarcoma de Ewing. Al menos serán evaluadas las siguientes aproximaciones:

- a) Inactivación del gen EWS-FLI1 mediante inserción de terminadores transcripcionales en la región central del gen.
- b) Inactivación del gen EWS-FLI1 mediante delección de todo o parte del gen.
- c) Inactivación del gen EWS-FLI1 mediante inactivación directa del gen FLI1.

Para evaluar las diferentes estrategias se establecerán líneas celulares de Ewing con expresión constitutiva o inducible de Cas9 que serán utilizadas para evaluar de forma rápida y reproducible las diferentes aproximaciones experimentales. La inactivación del gen se confirmará mediante caracterización de las alteraciones genéticas producidas, confirmación de la ausencia de expresión de EWS-FLI1 a nivel de ARNm y proteína y estudios funcionales (p. ej. proliferación). También se analizará la existencia de off-targets (alteraciones genéticas no deseadas) que serán claves para determinar la seguridad de las diferentes aproximaciones.

Una vez identificada la mejor estrategia en términos de especificidad, efectividad y reproducibilidad se procederá a reproducir las condiciones mediante transfección/electroporación/infección de plásmidos codificantes para Cas9/sgRNAs o transfección/electroporación de ribonucleoproteína Cas9/sgRNA con la vista puesta en el desarrollo de los métodos de transporte y vehiculización de las terapias.

### **OBJETIVO 2. Evaluar diferentes estrategias para el transporte de la maquinaria de editado a las células diana de sarcoma de Ewing.**

Para ello se evaluarán las diferentes estrategias primero *in vitro* utilizando varias líneas celulares de sarcoma de Ewing y células de otros tumores infantiles sin fusión EWS-FLI1 como controles negativos, que además nos ayudarán a determinar la especificidad de las diferentes aproximaciones experimentales.

Se evaluarán los siguientes métodos:

- a) Vectores virales. Es uno de los métodos más eficaces. Por el contrario, presenta varios problemas de inmunogenicidad que pueden comprometer su uso *in vivo*. En el contexto de este proyecto diseñaremos diferentes vectores virales (adeno-asociados, lentivirus y adenovirus) para la expresión de Cas9, sgRNAs y DNA donantes correspondientes.
- b) Vehículos no virales. Aunque menos efectivos en muchos casos que los métodos virales, los métodos no virales tienen la ventaja de que en general son menos inmunogénicos y

por tanto con mejores propiedades para su uso *in vivo*. Nosotros pondremos especial interés en el desarrollo de nanovesículas para transportar los componentes de la maquinaria de editado. Además, desarrollaremos una tecnología propia para dirigir estas nanovesículas específicamente a las células de sarcoma de Ewing. De todas formas, también tendremos en consideración el empleo de otros métodos como nanopartículas de oro que también han mostrado eficacia en experimentos *in vivo*.

**OBJETIVO 3. Evaluar en modelos animales (investigación preclínica) la eficacia de los diferentes métodos desarrollados.**

Finalmente, y una vez establecidos las aproximaciones experimentales más eficaces y específicas analizaremos su eficacia en modelos animales. En estos experimentos analizaremos el efecto del tratamiento sistémico sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Los resultados obtenidos nos permitirán confirmar la viabilidad real de esta aproximación antes de plantearnos el desarrollo clínico de la terapia.

## EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR SOBRE EL TEMA

El Dr. Javier Alonso, investigador principal (IP) de este proyecto, se ha centrado durante los últimos 15 años en la investigación del cáncer infantil. Una de las principales líneas de investigación del grupo es la identificación y caracterización funcional de los genes diana de la oncoproteína EWS-FLI1 característica de los sarcomas de Ewing. Así, el grupo ha contribuido a la identificación de una serie de genes diana EWS-FLI1 relevantes para el desarrollo de Sarcoma de Ewing, como DAX1 (NR0B1) (Mendiola y col., Int J Cancer 2006, Garcia-Aragoncillo et al., Oncogene 2008, Lalli E y Alonso J. Expert Opin Ther Targets 2010), CCK (Carrillo et al., Clin Cancer Res 2007, Carrillo et al., Anti- Cancer Drugs 2009), DKK1 (Navarro et al., Carcinogenesis 2010), LOX (Agra y otros, PLoS One 2013), EGR2 (Grünewald) TGP et al., Nature Genetics 2015) o SPRY1 (Cidre-Aranaz et al., Oncogene 2016), algunos de los cuales han sido propuestos como nuevas dianas terapéuticas (Cidre-Aranaz et al., Front Oncol 2015). Una de las contribuciones más destacadas del grupo al campo de la investigación en el sarcoma de Ewing ha sido el establecimiento de modelos de células inducibles de knockdown de EWS-FLI1, que se han utilizado como modelos celulares de referencia en el consorcio ASSET (Analyzing and Striking the Sensibilidades de los tumores embrionarios) (Hertz et al., 2016, Mutz CN et al., FEBS Lett 2016). En este sentido, el grupo es un experto en el estudio de las consecuencias que tiene la inhibición de EWS-FLI1 en estos tumores, aspecto este estrechamente relacionado con el objeto de esta propuesta. El grupo también ha estudiado la relación entre la inestabilidad genómica y los perfiles de expresión en sarcoma de Ewing contribuyendo a la definición de grupos de pacientes con peor pronóstico (Ferreira et al., Oncogene 2008) y recientemente, ha participado en varios proyectos multinacionales de GWAS para la identificación de variantes asociadas con la susceptibilidad y el pronóstico del sarcoma de Ewing (Postel-Vinay et al., Nature Genetics 2012; Ruiz-Pinto et al., Ann Oncol 2016). El grupo también ha participado en redes de investigación nacionales (RTICC, Programa "Tumores de la niñez y otros tumores ") e internacionales, como el consorcio europeo EuroEwing en el que el IP es responsable de la recolección, el almacenamiento y la gestión de muestras para los estudios biológicos del ensayo clínico EuroEwing 2012 (EudraCT: 2012-002107-17), coordinado en España por el Grupo Español de Investigación en Sarcomas (GEIS) y la Sociedad Española de Hemato-oncología Pediátrica (SEHOP).

## IMPACTO SOCIO-ECONÓMICO

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad en la edad pediátrica en los países industrializados. Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en el tratamiento de los tumores de la infancia y la adolescencia, muchos de ellos todavía tienen tasas de supervivencia inaceptablemente bajas. Uno de los cánceres infantiles con las peores tasas de supervivencia es el sarcoma de Ewing. De hecho, el 40% de los niños diagnosticados con sarcoma de Ewing morirán como consecuencia de la enfermedad.

Aunque el cáncer infantil es, afortunadamente, relativamente infrecuente, el impacto socioeconómico que tiene sobre el paciente y el entorno del niño enfermo (padres, familiares, colegio, etc...) es muy elevado. El paciente con cáncer infantil es un paciente que soportará durante el resto de su vida las secuelas del tratamiento, lo que tendrá un impacto notable en su vida y en el de las personas de su entorno. Prueba de la importancia que el cáncer infantil tiene para la sociedad es el creciente interés mostrado por fundaciones y organizaciones no gubernamentales por desarrollar proyectos de apoyo a las familias y también de apoyo a la investigación en todas sus vertientes (básica, clínica y traslacional). La aprobación de determinadas medidas legislativas para facilitar la conciliación de la vida laboral con el cuidado de un niño con cáncer (RD 1148/2011), así como el desarrollo de reglamentos comunitarios que obligan a la industria farmacéutica a desarrollar ensayos clínicos en niños previos a la autorización de nuevos medicamentos (CE 1901/2006), dan también una idea de la importancia socioeconómica que tienen estas enfermedades. Por lo tanto, sigue siendo imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias y abordajes terapéuticos novedosos, que permitan seguir incrementando las tasas de supervivencia y disminuir los efectos secundarios de los tratamientos actuales.

## IMPACTO EN EL DESARROLLO DE TECNOLOGIAS E INNOVACIÓN

El enfoque experimental propuesto en este proyecto es un enfoque totalmente nuevo y vanguardista para el tratamiento del sarcoma de Ewing. El proyecto permitirá evaluar la viabilidad experimental de una terapia génica diseñada para inactivar de forma permanente la alteración “driver” del sarcoma de Ewing, es decir, el oncogén EWS-FLI1. Además, este proyecto nos permitirá evaluar diferentes métodos para transportar la maquinaria de edición génica a las células de sarcoma de Ewing de manera específica y segura. Los resultados generados y la experiencia acumulada durante el desarrollo del proyecto podrán además trasladarse fácilmente a otros tipos de tumores, principalmente varios tipos de sarcomas, que también se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas que generan proteínas de fusión oncogénicas (p. ej., PAX3-FOXO1A, rhabdomiosarcoma alveolar, SYT1-SSX1, sarcoma sinovial, FUS-CHOP, fibrosarcoma mixoide, EWS-ATF1, sarcoma de células claras, etc.). Por otro lado, varias líneas celulares y plásmidos generados en este proyecto serán útiles en la investigación del sarcoma de Ewing, tanto en el

contexto de la investigación básica como en investigación traslacional y serán puestas a disposición de la comunidad internacional.

## MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO

El **laboratorio** del IP cuenta con un equipamiento completo para la realización de todas las técnicas de biología molecular y celular propuestas en el proyecto como cabinas de bioseguridad (1) y de PCR (1), nanodrop (1), centrífugas y microcentrífugas (4), termocicladores (4), termociclador PCR tiempo real (RG6000 Qiagen), termobloques (2), fuentes de electroforesis (3), cubetas electroforesis (2) y equipos de transferencia (2) neveras y congeladores (3), ultracongeladores (1).

Además, el **departamento** dispone de equipamiento de uso común que incluye lector de placas Tecan Infinite M200 (1) (para absorbancia, fluorescencia y luminiscencia), fodocumentadores de fluorescencia (2) (BioRad GelDoc 2000, DNR MiniBis Pro) y luminiscencia-ECL (1) (BioRad ChemiDoc XRS+), PCR cuantitativa (Roche Light Cycler 1.5), centrífugas (2) (Sorvall RC5C, Beckmann Avant J-301) y ultracentrífugas (1) (Beckman Optima XPN) con sus correspondientes rotores, citómetro de flujo (MACSQuant Analyzer, Miltenyi), microscopios de fluorescencia (2) (Zeiss AXIO ImagerX1, Axiovert 40CFL), Nanosight NS300 para la caracterización de exosomas, y dos cuartos de cultivo de uso compartido perfectamente equipados, uno de ellos dedicado exclusivamente al trabajo con virus.

Por último, en el campus contamos con una serie de **servicios comunes** de apoyo a la investigación:

- Unidad de Genómica: Dispone de un secuenciador capilar (ABI 3730XL), dos equipos de PCR cuantitativa (ABI 7500FAST, Roche LC480), 1 secuenciador MiSeq (Illumina), 1 secuenciador NextSeq500 (Illumina) y equipamiento asociado.
- Unidad de microscopia confocal dotada con un microscopio Leica TCS SP5 y sistema para estudios in vitro con control de temperatura, CO2 y humedad.
- Unidad de microscopia electrónica dotada con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai 12.
- Animalario que cuenta con instalaciones para la cría de animales de experimentación (ratones, conejos y coballas) y experimentación en condiciones SPF. Cuenta con un equipo de imagen in vivo IVIS Lumina 3XR (luminiscencia, fluorescencia y rayos X)
- Unidad de bioinformática con una completa infraestructura informática.

El centro cuenta con instalaciones autorizadas por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente para realizar actividades con Organismos Modificados Genéticamente tipo 2 (nº autorización A/ES/14/I-06)

## JUSTIFICACIÓN PRESUPUESTO

### A) Personal.

Se solicita financiación para contratar a un investigador predoctoral que estará totalmente dedicado a este proyecto y que además constituirá su tesis doctoral. El coste aproximado de un contrato predoctoral de cuatro años de duración es de 92.000 €

### B) Material fungible

Se solicita financiación para la adquisición de reactivos de laboratorio a razón de 30.000 euros/año y que comprenden:

- Reactivos biología molecular: Kits para las técnicas de PCR y clonaje (enzimas, kits de purificación, etc...). Reactivos para western-blot (anticuerpos, membranas y reactivos transferencia y revelado, etc..).
- Reactivos cultivo celular: suero de ternera fetal y medios de cultivo, consumibles cultivo celular (frascos, pipetas, etc...), antibióticos, cubetas electroporación.
- Contratación de servicios para la producción de virus. Reactivos para la producción y purificación de nanovesículas.
- Animales de laboratorio: ratones inmunodeficientes (NSG) para evaluar la eficacia de los tratamientos.
- Gastos publicaciones: para la publicación de resultados en revistas acceso abierto

### C) Equipamiento

No es necesaria la adquisición de equipamiento científico ya que el centro de investigación cuenta con todos los equipos e instalaciones necesarias para el desarrollo de este proyecto (instalaciones de cultivo celular BSL2, Unidad de Genómica, Unidad de Microscopía Confocal y Electrónica, Unidad de citometría de flujo, etc...).