

Convenio 15/051

CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE ROCHE FARMA, S.A Y LA FUNDACION PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA EN ANDALUCIA ORIENTAL – ALEJANDRO OTERO.

En Granada a 17 de Diciembre de 2015

REUNIDOS

De una parte
en calidad de Director Gerente de la Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria en Andalucía Oriental – Alejandro Otero (en adelante “FIBAO”), referenciada con C.I.F. G-18374199 y domicilio en Calle Doctor Azpitarte, 4-4ª Planta, 18012 Granada, con facultades suficientes para la suscripción del presente,

De otra parte
en calidad de representante de ROCHE FARMA S.A.(en adelante ROCHE), referenciada con C.I.F. A-08023145, y domicilio social en Madrid, C/ Eucalipto Nº 33, y con facultades suficientes para la suscripción del presente convenio.

Las Partes, manifiestan tener y se reconocen, mutua y recíprocamente, la capacidad legal necesaria para otorgar el presente documento, a cuyos efectos

MANIFIESTAN

Primero.- Que FIBAO es un fundación del entorno público de la Junta de Andalucía, inscrita en el Registro de Fundaciones Andaluzas con el nº GR 546, siendo su objeto fundacional promover y llevar a término la investigación biosanitaria en su ámbito de actuación, así como la promoción y el desarrollo de innovaciones en las tecnologías sanitarias, y potenciar la promoción profesional y la docencia de los profesionales de la salud.

Que FIBAO actúa como Entidad Gestora del Centro y del Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada -ibs.GRANADA-. Dicho Instituto esta constituido en el seno de FIBAO que ostenta su titularidad jurídica, se configura como un espacio de investigación multidisciplinar con la participación de los Hospitales Universitarios Virgen de las Nieves y San Cecilio de Granada junto con la Universidad de Granada. La misión del ibs.GRANADA es la de desarrollar y potenciar un espacio científico multidisciplinar en biomedicina donde se desarrollen proyectos de investigación que

integren a grupos básicos con otros cuyos objetivos trascienden hacia una investigación traslacional.

Segundo.- Que ROCHE tiene voluntad e interés firme de apoyar proyectos de investigación con organismos públicos y privados relacionados con sus competencias.

Tercero.- Que ambas partes están interesadas en suscribir un Convenio que proporcione un marco adecuado para lograr el vínculo necesario para el establecimiento de una colaboración que garantice la consecución de los objetivos comunes pretendidos.

En virtud de lo cual,

ACUERDAN

Primero.- Que el objeto del presente convenio de colaboración es la creación de las bases jurídico-administrativas de referencia necesarias para el establecimiento de cuantas acciones de colaboración entre la FIBAO y ROCHE que sean legalmente posibles.

Segundo.- Que dichas acciones de colaboración hacen referencia a la participación conjunta en Proyectos de investigación, desarrollo e innovación en las áreas o líneas de investigación siguientes:

"Proyecto de determinación de exosomas tumorales en muestras de plasma sanguíneo".

Tercero.- Que en el presente convenio de colaboración participarán de forma abierta las siguientes instituciones, centros y grupos participantes:

- Hospital Universitario San Cecilio
- Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada
- Centro Nacional de Biotecnología.

Cuarto.- El objeto del presente Proyecto es *Determinar exosomas tumorales en muestras de plasma sanguíneo.*

Quinto.- No obstante lo anterior, cualquier otro ámbito de actuación y colaboración no específicamente recogido en este convenio de cooperación podrá ser suscrito a él sin más que las partes manifiesten documentalmente su mutuo interés e intención, en cuyo caso dicha documentación deberá ser expresamente añadida a este convenio, como anexo al mismo.

Sexto.- Comisión de seguimiento.

Se establece una "Comisión de seguimiento" del presente convenio de colaboración, la cual estará constituida por los siguientes miembros:

☐ Por parte de FIBAO:

Por parte del Centro de realización: |

La Comisión de Seguimiento se reunirá al menos una vez al año o a petición de un tercio de sus miembros. La Comisión tendrá carácter paritario, con un solo voto por cada una de las partes.

El coordinador del presente Proyecto será:

Los Investigadores Principales serán:

Séptimo.- Entrada en Vigor y Duración del Convenio.

El presente Convenio entrará en vigor el día de su firma y finalizará en un periodo de 12 meses. En el caso de que por mutuo acuerdo se decida la prórroga, dicha decisión deberá contar previamente con un informe en el que se ponga de manifiesto los beneficios de dicha prórroga en relación con el desarrollo del convenio.

Octavo.- Posibilidad de Cancelación.

Tanto FIBAO como ROCHE previa reunión de la Comisión de seguimiento a la que se refiere la Cláusula quinta, podrá interrumpir en cualquier momento cualquier proyecto o estudio amparado por el presente Convenio; ello, si se valorara que el desarrollo de la investigación no es satisfactorio en el modo o manera, así como podrá tomar la decisión en cualquier momento de dar por finalizado el Convenio por considerar que no es necesaria su continuación.

Noveno.- Relación laboral entre las partes.

La colaboración no implica relación laboral alguna con cualquiera de las partes que firman este convenio, y se basa en los principios de buena fe y de eficacia para que la labor investigadora pueda ser realizada con éxito.

Décimo.- Propiedad de los Resultados, Confidencialidad de la información y publicación de los datos.

La propiedad intelectual/industrial de los resultados que se obtengan como consecuencia de la ejecución de los trabajos realizados al amparo del presente convenio corresponderá a las instituciones a las que estén vinculados contractualmente los Investigadores/inventores. Los porcentajes de invención se repartirán en función de las aportaciones y trabajos realizados por cada uno de los investigadores que participen en el resultado final susceptible de algún tipo de protección Industrial/Intelectual, según la legislación actual.

Los resultados susceptibles de algún tipo protección que puedan surgir del proyecto de investigación, deberán ser evaluados previo a su publicación, pudiéndose publicar previo acuerdo expreso de las partes.

Toda publicación que recoja datos obtenidos a partir de los proyectos de investigación contemplados en el presente convenio, hará constar, en los agradecimientos, la colaboración entre TODAS las partes. Cuando dichos datos, resultados, descubrimientos, invenciones, métodos e información se presenten en reuniones científicas o se publiquen en revistas profesionales se hará mención del Hospital Universitario San Cecilio como centros en el que se ha realizado el proyecto.

Si durante la realización del convenio fuese necesario el tratamiento de datos de carácter personal, ambas partes se comprometen a observar en todo momento, y bajo su responsabilidad, las exigencias de la legislación vigente en España en materia de protección de datos de carácter personal y especialmente en relación con el deber de información al afectado, los derechos de acceso, rectificación y cancelación de sus datos y la obtención de su consentimiento para el tratamiento de sus datos de carácter personal.

En todo caso, ROCHE no tendrá acceso a datos de carácter personal que no hayan sido previamente disociados, impidiendo la identificación de individuos concretos.

Decimoprimer.- Precio y forma de pago

Se acuerda realizar por ROCHE una aportación de 12.600€ destinados a recursos necesarios para el buen fin del proyecto y tendrá el carácter de irrevocable en la medida en que éste efectivamente se realice con el alcance previsto. Asimismo, ROCHE podrá solicitar a FIBAO un informe justificativo del desarrollo del proyecto, para justificar el buen fin de los fondos.

La citada cantidad, a la que no resultará de aplicación el IVA de acuerdo con la legislación vigente al ser la Fundación una entidad de las beneficiarias de mecenazgo, será facturada a ROCHE por la Fundación según el siguiente calendario:

8.820€ a la firma del contrato

3.780€ a la entrega de la memoria de actividades, que se estima que tendrá lugar a lo largo del 2016

ROCHE abonará las facturas en los 60 días siguientes a su recepción, sin asumir más obligación o responsabilidad que la de aportar la cantidad aquí fijada al nº de cuenta de la que es titular la *Fundación FIBAO BMN-Caja Granada: IBAN: ES87 0487.3295.21.2000019694 SWIFT: GBMNESMMXXX*

[Handwritten signatures and initials]

Esta aportación será publicada a partir de 2016 en la web de Roche conforme a lo establecido en el Código de Buenas Prácticas de la Industria Farmacéutica, dado que se trata de una aportación a una Organización Sanitaria.

El presente Convenio podrá ser modificado mediante acuerdo entre las partes.

Y en prueba de conformidad, firman los intervinientes a un solo efecto y por duplicado ejemplar en lugar y fecha indicados en el encabezamiento.

Por FIBAO

Por ROCHE



FIBAO

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA
INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL
ALEJANDRO OTERO

Dr. Azpitarte, 4-4º Planta
18012 Granada
CIF: G-18374199

Aportada
501677995

El coordinador y representante de los Investigadores Principales

VºBº y Conforme del Gerente del Centro

TEMPLATE DE PROYECTOS PARA SOLICITAR UN CONVENIO DE COLABORACIÓN

Título de Proyecto

Proyecto de determinación de exosomas tumorales en muestras de plasma sanguíneo.

Justificación

Los exosomas constituyen una serie de exovesículas que forman parte del secretoma normal de cualquier célula de funciones biológicas no del todo conocidas y entre las que se han demostrado la inmunomodulación y la capacidad de transformación celular, es decir constituyen un mecanismo de comunicación intercelular y del que las células tumorales no son ajenas(1,2). Entre los componentes de dichas vesículas se encuentran lípidos procedentes en su mayoría de los dominios Raft de las membranas celulares, proteínas de superficie de las células (CD9, CD63, y CD81) y diversas proteínas entre las que se encuentran actina, Enolasa, Hsp70 y otras que actúan de proteínas marcadoras de la procedencia celular, junto a sARN y complejos enzimáticos. Pueden provenir directamente de la membrana en cuyo caso se denominan ectosomas o procedentes del directamente del aparato de Golgi, de los cuerpos multivesiculares, denominándose en este caso exosomas (3,4). Aunque los exosomas son liberados por muchos tipos celulares, pero son secretados especialmente en altas concentraciones por las células tumorales (5). La microvesiculación, el proceso de producción de exosomas, resulta tras la formación de pequeñas vesículas inferiores a los 100 nm de diámetro derivadas de la membrana celular y que se liberan al espacio extracelular por el proceso de exocitosis (6). La membrana que los conforma por tanto es un complejo lipídico que integra proteínas, mientras que la carga interior esta compuesta por proteínas y ácidos nucleicos. Estas nanovesículas pueden viajar a tejidos distantes donde se pueden fusionar con membranas de otras células e inducir cambios. En los últimos años se han visto implicaciones en el funcionamiento celular y particularmente de células tumorales (7). Los exosomas contribuyen a la génesis tumoral por dos procesos, el de modulación y restructuración del microambiente celular para generar nichos metastásicos (9) y el de modulación de la respuesta inmune (10).

Las proteínas transportadas por los exosomas han sido estudiadas en muestras de pacientes y en líneas celulares in vitro. Los estudios muestran que lo exosomas transportan proteínas del citoesqueleto, del complejo mayor de histocompatibilidad, traductores de señales, proteínas de choque térmico y una gran variedad más hasta haberse descrito mas de 4000 proteínas diferentes (10). Algunas de estas proteínas se encuentran en la mayoría de los exosomas, incluyendo genes supresores como las procedentes del gen 101 supresor de tumores, la proteína por choque térmico Hsp 70 y las tetraspaninas CD9, CD63, y CD81, mientras que otras son específicas del tipo de tejido. Algunas de estas proteínas como factores involucrados en la regulación del ciclo celular, p53, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de fibroblastos sugieren un papel de los exosomas en la transformación celular así como en la angiogénesis (11). La carga de los exosomas es interesante porque los exosomas se pueden fusionar con otras células y así promover respuestas en estas otras células. Esto es muy relevante en la génesis tumoral tanto en los tejidos circundantes como en la de las metástasis. Hay estudios que han demostrado la acción de proteínas de exosomas en ambos procesos, como la oncoproteína MET, KRAS mutado o el Factor Tisular (11). El microambiente celular puede además por si mismo promover la integración de los exosomas en las células. La membrana lipídica de los exosomas puede cambiar de composición y rigidez en respuesta a los descensos de pH, como ocurre en la hipoxia tumoral (12).

En exosomas derivados de tumores se ha encontrado un amplio rango de ácidos nucleicos, la mayoría microRNA o RNA mensajero (mRNA). Estos exosomas pueden transferir su carga a otras células e inducir cambios fenotípicos en ellas (15). Se ha visto que los exosomas derivados de tumores contienen distintos perfiles de microRNA en distintos cánceres, incluidos próstata (15), pulmón (16), mama (17) y ovario (13). Hay estudios que demuestran que la transferencia de onco-microRNAs a células diana puede modular respuestas en los tejidos huéspedes. Estos estudios muestran que las funciones oncogénicas del microRNA van desde las protumorales hasta las antitumorales. Hay estudios que revelan que los exosomas contienen mRNA mutado y fragmentos de DNA que pueden contribuir al crecimiento y proliferación de muchos tumores primarios y de metástasis (18).

Los exosomas en la formación de nichos metastásicos

Algunos eventos en la formación del nicho pre-metastásico han sido asociados con los exosomas, incluidos el aumento de la permeabilidad, proliferación y angiogénesis endotelial pulmonar (19). El seguimiento in vivo de exosomas marcados inyectados vía intravenosa a ratones ha demostrado que los exosomas circulantes son captados de la circulación sistémica a los tejidos como el hígado, pulmón, riñón y bazo (20). Exosomas derivados de células renales tumorales tienen un amplio rango de factores protumorales, ratones a los que se les inyectan estos exosomas han presentado un aumento de las metástasis pulmonares (21).

Objetivos

OBJETIVO PRIMARIO:

- Determinar niveles de ExTC en muestras de sangre.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Valorar la evolución de los niveles de ExTC.
- Comprobar que los ExTC remedan inmunofenotípicamente a la célula de la que proceden.
- Identificación de nuevos marcadores mediante secuenciación del perfil proteico de los ExTC
- Comprobar la presencia de ki-67 en los ExTC

Metodología/Descripción

Se obtendrán las muestras de plasma desde otras muestras de sangre procedente del biobanco del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Tras la obtención del plasma, se procederá a:

- Aislamiento exosomas.
- Purificación .
- Estudio ultraestructural de exosomas
- Caracterización de los exosomas por citometría de flujo y western blot

Desarrollando los puntos anteriores:

En el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, Grupo de investigación Bioquímica y Parasitología Molecular grupo CTS 183 se procederá al aislamiento, purificación y caracterización de los ExTC.

La purificación de los exosomas se llevará a cabo tras una centrifugación del plasma inicial a 1500 g durante 20 minutos para eliminar restos celulares, después se procederá a una ultrafiltración del sobrenadante por 0.22 µm y el resultado de la filtración se centrifugará a 150.000 g en una ultracentrífuga durante 2 horas. El pellet recogido se centrifugará a la misma



velocidad en gradiente de sacarosa a 150.000 g discontinuo, y recogiendo la banda correspondiente a 0.25 M se obtienen los exosomas. Éstos se lavan con PBS y ya se obtienen puros.

Una vez aislados y purificados se procederá a verificar su integridad. Para ello, llevaremos a cabo un estudio ultraestructural. Las muestras serán fijadas con glutaraldehído al 2.5 % en tampón cacodilato (0.1 M, pH7.4), 60 minutos a 4°C, fijadas con tetróxido de osmio (OsO₄, Merck) al 1% en tampón cacodilato (0.1 M, pH7.4), 60 minutos a 4°C, deshidratadas con mezclas crecientes de etanol e incluidas en resina EMbed 812. Después, se realizarán cortes ultrafinos de las muestras que se recogerán en rejillas de 200 mallas (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA) y éstas serán contrastadas con acetato de uranilo y nitrato de plomo. Finalmente, las rejillas serán estudiadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902.

Seguidamente llevaremos a cabo la caracterización de los exosomas con objeto de discriminar los exosomas tumorales de los que no lo son y procedan de otras células. Analizaremos la expresión de marcadores característicos, tanto de exosomas tumorales como el CD63, CD9, CD81, HSP70, lamp1, entre otros, como de los marcadores que permiten establecer los diferentes subtipos de cáncer de mama, receptor de estrógenos, de progesterona, her-2 y ki-67.

El perfil proteico de las diferentes proteínas de los ExTC será secuenciado en los servicios de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología

El estudio de la expresión de marcadores se realizará lavándose dicha banda por citometría de flujo y western blot. Para la citometría de flujo utilizaremos anticuerpos primarios conjugados con fluorocromos (inmunofluorescencia directa). Las muestras serán incubadas con 0.1-10 µg/ml del anticuerpo durante 30 min a temperatura ambiente, y seguidamente serán analizadas por citometría de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson). Para el western blot, el pellet de exosomas será resuspendido en tampón RIPA suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas. Las proteínas serán separadas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y transferidas a membranas Immobilon-P (Millipore). Posteriormente se llevará a cabo el bloqueo, el lavado e incubaciones de las membranas de nitrocelulosa con los anticuerpos primarios (a las diluciones recomendadas) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se incubará con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, para finalmente visualizar las bandas por quimioluminiscencia y cuantificar las mismas por densitometría (Quantity One; Bio-Rad).

Duración

3 años

Memoria Económica

Reactivos de laboratorio de preparación de muestras biológicas 12000 euros

Medios de cultivo y aislamiento de exosomas 4000 euros

Caracterización de exosomas y proteínas 28000 euros:

- Anticuerpos primarios: antiactina, antienolasa, antitranspaninas, CD63, CD9, CD81, HSP70, lamp1, receptor estrógenos, receptor progesterona, her-2, ki-67, entre otros.
- Anticuerpos secundarios conjugados con HRP o fluorocromos.
- Sistemas de concentración de exovesículas
- Electroforesis SDS-PAGE
- Enzimas y reactivos de inmunoblott y secuenciación de proteínas

Material de laboratorio de un sólo uso 6000 euros

Se ha solicitado una ayuda al INSTITUTO CARLOS III (ICIII)

La partida solicitada a Roche son 12.600€ para financiar el presupuesto de caracterización de exosomas y proteínas.

Bibliografia:

1. Kalra H, Adda CG, Liem M, et al: Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics* 2013, 13:3354–3364
2. Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, et al. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* (2003) 63(15):4331–7
3. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* (2008) 110(10):13–21
4. Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* (2009) 10(1):42–6
5. Tavoosidana G, Ronquist G, Darmanis S, et al. Multiple recognition assay reveals prostasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(21):8809–14
6. Tickner JA, Urquhart AJ, Stephenson SA et al. Functions and Therapeutic Roles of Exosomes in Cancer. *Front Oncol* 2014 May 27;4:127. eCollection 2014
7. Webber J, Yeung V, Clayton A. Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Feb 7. pii: S1084-9521(15)00025-7.
8. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* (2009) 9(4):285–93
9. Zhang H-G, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* (2011) 17(5):959–64
10. Kharaziha P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim Biophys Acta* (2012) 1826(1):103–11
11. Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* (2009) 284(49):34211–22
12. Park JA, Sharif AS, Tschumperlin DJ, et al. Tissue factor-bearing exosome secretion from human mechanically stimulated bronchial epithelial cells in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 130(6):1375–83
13. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* (2006) 20(5):847–56
14. Hessvik NP, Phuyal S, Brech A, et al. Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* (2012) 1819(11–12):1154–63
15. Rosell R, Wei J, Taron M. Circulating microRNA signatures of tumor-derived exosomes for early diagnosis of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* (2009) 10(1):8–9
16. Corcoran C, Friel AM, Duffy MJ, et al. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clin Chem* (2011) 57(1):18–32
17. Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* (2011) 2(3):344–581
18. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* (2008) 10(12):1470–6
19. Hong B, Cho J-H, Kim H, et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* (2009) 10:556.10.1186/1471-2164-10-556
20. Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, et al. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J Biotechnol* (2013) 165(2):77–8410
21. Grange C, Tapparo M, Collino F, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* (2011) 71(15):5346–5610

SOLICITUD COLABORACIÓN DE ROCHE PROYECTO CIENTÍFICO/EXPERIMENTAL
PUEDE SUSTITUIRSE POR SOLICITUD DE LA ENTIDAD QUE INCLUYA AL MENOS ESTOS DATOS:

Roche Farma, S.A.
c/ Eucalipto, 33
28016.- Madrid

Madrid, 16 de Noviembre de 2015

Asunto: Colaboración económica para el apoyo de proyecto científico/experimental
Determinación de exosomas tumorales en muestras de plasma sanguíneo.

Entidad Solicitante:

Denominación (Fundación, Asociación o Sociedad Científica): FUNDACIÓN FIBAO

CIF: G-18374199

Objeto de la entidad: Le: entidad sin ánimo de lucro, de carácter científico y educacional

Fundada en

Número de profesionales sanitarios que integra: 0-10 ☐

11-50 ☐

más de 50 ☒

Título del proyecto: Determinación de exosomas tumorales en muestras de plasma sanguíneo.

SE ADJUNTA: Memoria científica explicativa

Presupuesto global desglosado del proyecto

Cantidad solicitada: 12.600 €

Mayoritaria (>50%) ☐

Minoritaria (hasta 50%) ☒

Firma del Solicitante:

Nombre y apellido: [Redacted]

Vinculación:

Administrador ☐

Apoderado ☐

Colaborador ☒

ATENCIÓN: Para respetar la independencia de las entidades con las que colabora, Roche no financiará más del 30% del presupuesto o ingresos anuales de esa entidad. Si prevé que puede superar ese porcentaje, por favor marque esta casilla ☐