



Hospital Universitario La Paz
Fundación para la Investigación Biomédica
Comunidad de Madrid



CONVENIO DE COLABORACIÓN EMPRESARIAL EN ACTIVIDADES DE INTERÉS GENERAL
ENTRE
LA FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ
Y
LA FUNDACION LA SONRISA DE ALEX
Y
LA FUNDACION MARI PAZ JIMENEZ CASADO

En Madrid, el día 15 de Marzo de 2016

REUNIDOS

De una parte Doña Ana Coloma Zapatero, en su calidad de Directora de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (en adelante FIBHULP) con C.I.F G83727057 y domicilio en Paseo de la Castellana, nº 261 de MADRID, con facultades suficientes para la suscripción del presente.

De otra parte, Don Javier Carrasco Santiago, con N.I.F 46.885.927J, en calidad de Presidente de la Fundación La Sonrisa de Alex para la Investigación y Tratamiento del Sarcoma de Ewing (en adelante FSA) con domicilio social en C/ de las Cortes nº 7, 6º Izquierda, de Pamplona (NAVARRA) y con C.I.F G71198675, con facultades suficientes para la suscripción del presente.

Y de otra parte, Don Javier Martínez Gutiérrez y Don Alberto Martínez Gutiérrez, con DNI 51.614.327G y 51.607.421K respectivamente, en representación en calidad de apoderados de la Fundación Mari Paz Jiménez Casado (en adelante FMPJC) con domicilio social en Plaza Valparaíso, nº 4 - Escalera Derecha - 5º G - de Madrid (28016) y con C.I.F G86630852, con facultades suficientes para la suscripción del presente.

Las Partes, manifiestan tener y se reconocen, mutua y recíprocamente, la capacidad legal necesaria para otorgar el presente documento, entendiéndose que el mismo tiene su encaje legal dentro de lo que el artículo 25 de la Ley 49/2.002 denomina "Convenios de colaboración empresarial en actividades de interés general", a cuyos efectos

EXPONEN

Primero.- Que la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz ha presentado a la consideración de la Fundación La Sonrisa de Alex y la Fundación Mari Paz Jiménez Casado la solicitud de colaboración para la realización del proyecto científico titulado: "Inmunoterapia en sarcomas: combinación del anticuerpo antiCXCR4 y



Hospital Universitario La Paz
Fundación para la Investigación Biomédica
Comunidad de Madrid



la terapia celular NK". Dicho proyecto no incluye análisis de utilización de fármacos en pacientes. El investigador principal es el Dr. Antonio Pérez Martínez.

Segundo.- Que la FUNDACIÓN MARI PAZ JIMÉNEZ CASADO (FMPJC) es una Fundación de nacionalidad española con fines no lucrativos, legalmente constituida que tiene como fines de interés general en los términos más amplios posibles:

- Ayudar en todo tipo de limitaciones, pero particularmente en casos de emergencia, a las personas y familias necesitadas para que puedan acceder a servicios educativos, culturales, sociales y sanitarios con especial preferencia por las personas que, como ella, sufran una situación de necesidad, ya sea por enfermedad, desplazamiento, carencias afectivas o económicas.
- Fomentar la cultura del voluntariado e impulsar el ejemplo de vida y comprensión iniciada por Mari Paz en la ayuda a los desfavorecidos y necesitados.
- La investigación en el ámbito de la enfermedad humana, en particular, sin ser excluyente, en el ámbito oncológico, y de forma especial en el Sarcoma.

Tercero.- Que la FUNDACION LA SONRISA DE ALEX (en adelante FSA) es una Fundación de nacionalidad española con fines no lucrativos, legalmente constituida que tiene como fines de interés general en los términos más amplios posibles:

- Contribuir al desarrollo del estado actual de conocimiento científico y la experiencia clínica para el tratamiento del cáncer infantil, y especialmente el del sarcoma de Ewing.
- La prestación de asistencia médica, social, psicológica, pedagógica o de cualquier clase, a personas afectadas directa o indirectamente por el cáncer infantil.

Cuarto.- Que la FMPJC y la FSA están incluidas entre las que se citan como beneficiarias del mecenazgo en el artículo 16 de la Ley 49/2002, de 23 de diciembre, de régimen fiscal de las entidades sin fines lucrativos y de los incentivos fiscales al mecenazgo.

Quinto.- Que FMPJC y FSA tienen vocación y voluntad firmes de apoyar proyectos de investigación con organismos públicos y privados, y está interesada en llevar a cabo este Convenio específico de colaboración con la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz.

Sexto.- Que la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz posee la infraestructura necesaria, para abordar el proyecto de investigación científica mencionado.

Séptimo.- Que la situación apuntada proporciona un marco adecuado para lograr el vínculo necesario para el establecimiento de una colaboración que garantice la consecución de los objetivos comunes pretendidos, de acuerdo con las siguientes

CLÁUSULAS

Primera.- Objeto del convenio



Hospital Universitario La Paz
Fundación para la Investigación Biomédica
Comunidad de Madrid



Este Convenio tiene como finalidad preferente el fomento y el desarrollo de la investigación en las Ciencias de la Salud, dentro de cuyo ámbito se incluye el proyecto de investigación "Inmunoterapia con células natural Killer en el cáncer Infantil" que se adjunta en el Anexo I del presente convenio.

Por ello a través del presente convenio se regulan los derechos y obligaciones que regularán la relación entre las Partes para asegurar el correcto uso de la financiación y el cumplimiento del Proyecto.

Segunda. Naturaleza.

Las partes declaran el presente como convenio de colaboración. En ningún caso, debe considerarse que persigue los fines de los contratos de patrocinio publicitario recogidos en el artículo 24 de la Ley 34/1988, de 11 de noviembre, General de Publicidad.

Tercera.- Responsabilidad, seguimiento e información

El Doctor Antonio Pérez Martínez se compromete a hacer cumplir las normas que regulan los trabajos de investigación y, para el objeto del presente convenio, dispone de las autorizaciones de la Dirección del Hospital y del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del hospital. A la firma del presente contrato se entregará a FMPJC Y FSA los certificados que justifican que los proyectos desarrollados por el Dr. Antonio Martínez Pérez en el Hospital Universitario La Paz, cuentan con las aprobaciones pertinentes.

Siempre que la FMPJC y la FSA lo soliciten, FIBHULP se compromete a informar sobre el desarrollo del proyecto científico mediante un informe del estatus del mismo.

El investigador principal enviará con carácter semestral y con una antelación de al menos 15 días a la realización de los pagos, un informe a la FMPJC y a la FSA, en el que conste la evolución del proyecto, y que cuente con el visto bueno de la FIBHULP.

Cuarta.- Condiciones económicas

La colaboración en el proyecto de investigación referido, se traducirá en la financiación de una cuantía total de SESENTA MIL EUROS (60.000€) cuya distribución y plazos de pago se detalla en el Anexo II del presente Convenio.

Tanto la FMPJC como la FSA, aportarán cada una de ellas las cantidad de TREINTA MIL EUROS (30.000€).

A la citada cantidad, no será aplicable el IVA ya que este convenio se acoge a la regulación prevista en la Ley 49/2002 de 23 de diciembre, regulándose por lo aquí expresamente pactado y, en lo previsto, por lo establecido en la citada Ley y en la demás legislación aplicable.

La Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz remitirá a FMPJC y la FSA los certificados correspondientes a las aportaciones realizadas.



Hospital Universitario La Paz
Fundación para la Investigación Biomédica
Comunidad de Madrid



Quinta.- Finalidad

La finalidad específica de la colaboración se refiere a la financiación del proyecto explicitado en la cláusula primera y en el Anexo I.

Sexta.- Duración

La colaboración en el proyecto científico referido se concederá por el periodo de dos años finalizando en Marzo de 2018, iniciando su vigencia en el momento de su firma.

El presente convenio se extinguirá por el incumplimiento de las obligaciones derivadas del presente acuerdo

Al término de dicho plazo, y en el caso en que el proyecto de investigación a que se hace referencia en la cláusula primera no hubiera finalizado las partes firmantes del presente convenio podrán de mutuo acuerdo prorrogar el convenio de colaboración durante otro año o hasta la finalización del proyecto de investigación en el caso en que se estime que éste terminará en un plazo de tiempo inferior.

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 proyecto.

Séptima.- Posibilidad Cancelación

FMPJC y la FSA podrán interrumpir en cualquier momento previo aviso de dos meses su aportación económica objeto del presente Convenio; ello, si valoran que el desarrollo de la investigación no es satisfactorio en el modo o manera, de tal forma que no considere necesaria la continuación del proyecto. La Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz podrá resolver de igual manera si FMPJC y la FSA no cumplieran lo establecido en el presente Convenio de colaboración.

En estos casos, se hará un ajuste de pagos pendientes por parte de FMPJC y la FLSdA en relación con el trabajo desarrollado hasta la fecha de rescisión del contrato y quedarán cancelados los pagos que se habían previsto en relación con el trabajo previsto con posterioridad a la fecha de cancelación del convenio. En ningún caso esto supondrá que la colaboración económica global quede por debajo de la cifra de 1.000 Euros.

En el supuesto de que el proyecto objeto de este convenio no pudiese llevarse a cabo por incumplimiento de los compromisos adquiridos por FIBHULP, la FMPJC y la FSA quedarán relevados de sus obligaciones.

Octava.- 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.

Novena.- Propiedad intelectual e industrial

Los derechos intelectuales de todo el material, información y conocimiento aportados por cada una de las PARTES e incluso por terceras, no se verán modificados y pertenecerán a todos los efectos y por tiempo indefinido a cada una de las PARTES o tercero que los aportó.

Décima.- Confidencialidad de la información y publicación de los datos

Toda publicación que recoja datos obtenidos a partir del proyecto contemplado en el presente convenio, hará constar, en los agradecimientos, la aportación de FMPJC y la FSA.

El presente convenio está basado en la confianza y total transparencia entre las partes, por tanto para garantizar su uso adecuado podrá ser dado a conocer a quien se interese por el mismo.

En reconocimiento a la colaboración prestada, LA FUNDACIÓN hará constar en la información y publicidad que realice, el nombre de la FMPJC y la FSA, así como en su web, newsletters, publicaciones y en eventos realizados para presentar este proyecto.

Por su parte, la FMPJC y la FSA, podrán informar de esta aportación económica destinada a financiar este proyecto donde estimen oportuno y podrán figurar en sus Memorias de Actividades y páginas web.

Undécima.- La Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz se compromete a respetar la normativa vigente y a cumplir con las obligaciones que le imponen las disposiciones aplicables a la realización del Proyecto científico comprendiendo la cumplimentación de cualquier notificación y/o comunicación preceptiva y obtención de cualquier autorización que deba recabarse, ya sea de las autoridades sanitarias o de los responsables de los centros sanitarios. Si así se fija en el proyecto, será imprescindible la firma del Consentimiento Informado previo de cada paciente.

La FIBHULP procurará la asistencia de los miembros del equipo investigador que llevará a cabo el Proyecto objeto del presente convenio, a aquellos actos o eventos que sean organizados por la FMPJC y la FSA, teniendo en cuenta siempre la disponibilidad de las personas participantes. Así mismo facilitará el concierto de visitas de aquellas personas que la FMPJC y la FSA designen, a los centros donde se desarrolla el Proyecto, siempre que sea posible y no altere el normal funcionamiento de los citados centros.

Duodécima.- Cualquier conflicto que pueda surgir de la interpretación, ejecución o validez del presente Convenio, las partes se someterán a arbitraje de acuerdo con las Normas y



Hospital Universitario La Paz
Fundación de Investigación Biomédica
Comunidad de Madrid



Tribunales de Arbitraje de Madrid. Las partes aceptan dicho arbitraje y se comprometen a acatar la resolución final adoptada.

Décimotercera.- Comunicaciones

Las partes señalan como domicilio a efectos de comunicaciones los que se derivan de la comparecencia del presente convenio.

Las modificaciones al presente convenio tendrán que formalizarse en adenda que deberán firmar todas las partes.

Habiendo leído el presente documento y hallándolo conforme, lo firman las partes por duplicado y a un solo efecto en el lugar y fecha al inicio indicados

Por la Fundación para la
Investigación Biomédica del
Hospital Universitario La Paz

Por la Fundación La Sonrisa de Alex y

Fdo.: D^a. Ana Coloma Zapatero

Fdo.: Don Javier Carrasco Santiago

Por la Fundación Mari Paz Jiménez Casado

Fdo: Don Javier Martínez Gutiérrez

Fdo. Don Alberto Martínez Gutiérrez

Enterado y Conforme El Investigador

Fdo.: Dr. Antonio Pérez Martínez

Proyecto de investigación:
**“Inmunoterapia en sarcomas: combinación del anticuerpo
antiCXCR4 y la terapia celular NK”.**

Investigador Principal: Antonio Pérez Martínez.
Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica del Hospital Universitario La Paz, Madrid.
Grupo de Investigación de Inmunidad Innata, Instituto de Investigación Sanitaria La Paz

1. INTRODUCCIÓN:

A pesar de los progresos alcanzados en el tratamiento de los sarcomas en la población pediátrica/adultos jóvenes, la presencia de metástasis así como las recaídas implican sin embargo una tasa de supervivencia de apenas el 20%, sin que dicho dato haya experimentado ninguna mejoría en las últimas décadas.

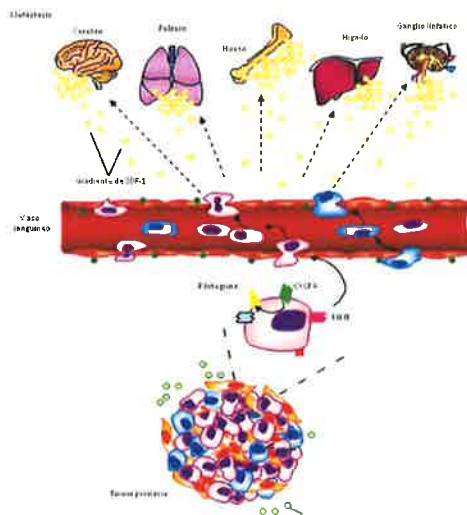
Durante los últimos años las quimioquinas y su interacción con sus correspondientes receptores han demostrado jugar un papel fundamental en los mecanismos del desarrollo del cáncer y la aparición de metástasis. Los niveles de expresión de las quimioquinas y sus receptores se alteran en las células malignas. Es el caso de CXCR4, el receptor de quimioquinas más frecuentemente sobreexpresado en las células tumorales. La interacción de CXCR4 con su ligando, CXCL12, activa una cadena de mecanismos celulares que promueven la supervivencia, proliferación, adhesión y/o migración de las células tumorales que lo expresan (1). Todo ello puede desembocar no sólo en el desarrollo del tumor primario, sino en el incremento de la capacidad de generar metástasis a distancia en órganos en los que se secreta el ligando.

Recientemente, el equipo del doctor Khune (Bristol-Myers Squibb) desarrolló un anticuerpo monoclonal (BMS-936564/MDX-1338) a partir de la inmunización de ratones transgénicos para los genes de las inmunoglobulinas humanas mediante transducción de células de ratón transfectadas con CXCR4 humano. Comercializado como Ulocuplumab, es un mAb de alta afinidad, e isotipo IgG4, que bloquea CXCR4 e impide la interacción con su ligando CXCL12, inhibiendo los mecanismos celulares a través de los cuales esa interacción promovería la proliferación y migración celular (2).

Antecedentes:

El eje CXCR4 – CXCL12 y su papel en la patogénesis del cáncer y las metástasis:

El receptor CXCR4 se expresa de forma fisiológica en células del linaje hematopoyético, incluyendo células natural killer (NK), y en menor medida en células endoteliales y epiteliales, astrocitos, y neuronas. Sólo se ha identificado un ligando de CXCR4: CXCL12 o SDF1 (stromal cell-derived factor 1) (3), quimioquina que ha mostrado inducir migración y proliferación celular y estimular la angiogénesis (4). Por su parte, CXCR4 se sobreexpresa en el 75% de todos los cánceres, incluyendo sarcomas. En algunos casos, incluso se ha demostrado una correlación inversa entre la expresión de CXCR4 en un determinado tumor y su pronóstico (5).



Papel del eje CXCR4/SDF1 en el proceso de metástasis.
Gelmini et al, 2008

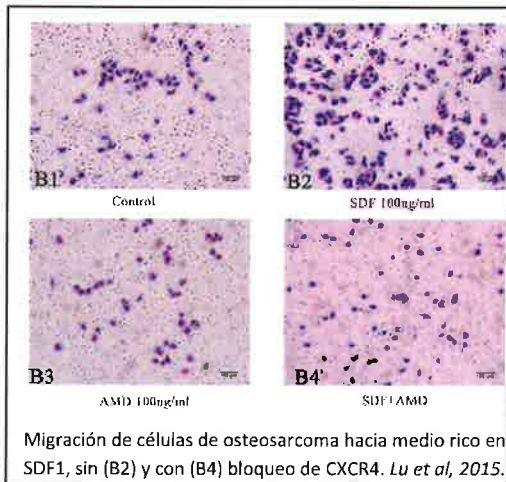
Se ha demostrado la presencia de CXCL12 en tejidos donde típicamente metastatizan los tumores, como pulmón, mama, médula ósea y ganglios linfáticos. El gradiente de CXCL12 generado en estos órganos fomentaría la atracción hacia ellos de células tumorales con alta expresión de CXCR4. La interacción de ambos daría lugar a fenómenos de angiogénesis y de activación de integrina $\beta 1$ y metaloproteasas, que desembocarían en la generación de las metástasis en los órganos diana. Varios estudios han demostrado una disminución en la aparición de micrometástasis en modelos

murinos a través del bloqueo de CXCR4 (6, 7).

El eje CXCR4 – CXCL12 en los sarcomas:

La sobreexpresión de CXCR4 ha sido como decimos estudiada en diversos tipos de tumores sólidos, incluyendo los sarcomas.

El sarcoma osteogénico (osteosarcoma) es el tumor óseo más frecuente en la infancia y la población adolescente, y se caracteriza por una alta agresividad local, sumada a una tendencia a metastatizar en pulmón y otras regiones del esqueleto. El fracaso de las terapias actuales en los casos metastáticos y las recaídas podría estar relacionado con la incapacidad de aquéllas a la hora de eliminar las TICs (células iniciadoras de tumor) (8), descritas por su capacidad para crecer formando esferas (sarcosferas) (9) y sus marcadores de superficie, entre los que se encuentra CXCR4. La expresión de este receptor en el osteosarcoma está



relacionada de forma inversa con el pronóstico (5, 6, 10). En un estudio realizado con xenoinjertos de osteosarcoma en ratones, se observó que el bloqueo de CXCR4 disminuía el grado de osteolisis local y daba lugar a una disminución significativa en el número de micrometástasis en el pulmón (si bien no se observó efecto sobre el número de metástasis macroscópicas) (6).

Se ha estudiado también la expresión de receptores de quimioquinas en el rabdomiosarcoma, tumor maligno de tejidos blandos de especial relevancia en la población pediátrica. Hasta el momento existen pocos estudios acerca de la expresión de receptores de quimioquinas en este tipo de tumores.

Recientemente se ha publicado un estudio al respecto, comprobando la expresión de receptores de quimioquinas y sus ligandos en 15 muestras de tumor derivadas de 9 pacientes (11 primarios y 4 recaídas). Se identificó la expresión de CXCR4 y CXCR7, y sus respectivos ligandos CXCL12 Y CXCL11, en todas las muestras estudiadas. En correspondencia con publicaciones anteriores, que referenciaban la mayor expresión de CXCR4 y CXCR7 en rabdomiosarcoma alveolar (RMSA) que en el embrionario (RMSE), el ratio CXCL12/CXCR4 y CXCL11/CXCR7 fue significativamente menor en el RMSA (en las muestras de xenoinjertos estudiadas) (7). En la misma línea, otro estudio anterior evidenciaba la expresión del receptor en dos de las cinco líneas de rabdomiosarcoma estudiadas (SJCRH30 y RH30), ambas de estirpe alveolar, estando ausente en las líneas de RMSE (11). Este equipo desarrolló un anticuerpo monoclonal antiCXCR4, el CF172, y, tras comprobar el incremento de la migración celular en las líneas que expresaban CXCR4 hacia un medio enriquecido con CXCL12 respecto a un control, demostraron que la administración del anticuerpo inhibía dicha migración, pero no así la proliferación a nivel local (en presencia o ausencia de CXCL12). De hecho, en los xenoinjertos estudiados hubo sólo pequeñas diferencias en el tamaño del tumor primario tras la administración de CF172, y sin embargo sí fue significativa la inhibición de las metástasis linfáticas con la administración del anticuerpo.

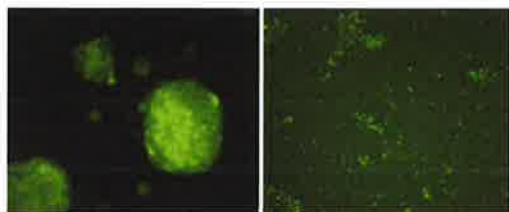


Evolución de xenosarcoma en tratamiento con IgG vs bloqueante de CXCR4. Brennecke et al, 2014.

El papel antitumoral de las células NK:

Las células Natural Killer (NK) constituyen una subpoblación de células linfoides con capacidad citotóxica innata, capaces de destruir células infectadas por virus y células tumorales (12), y de intervenir en la inmunidad adaptativa a través de la secreción de citoquinas, como INF γ . En cuanto a la actividad antitumoral de las células NK, se han relacionado los niveles bajos de NK en sangre periférica con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer (13), así como la asociación entre la infiltración de células NK en el tumor y un mejor pronóstico (14).

Como ya se ha comentado, las células NK, al igual que otras células del sistema hematopoyético, expresan CXCR4, y su interacción con el ligando CXCL12 parece estar implicada en el mantenimiento de estas células en la médula ósea. De hecho, algunos estudios



Comportamiento de células de osteosarcoma formando sarcosferas, en ausencia (izquierda) y con células NK (derecha). *Fernández et al, 2015*

han demostrado un incremento en el número de NK circulantes en sangre periférica tras administración de AMD3100 (bloqueante de CXCR4), posiblemente por reclutamiento desde la médula ósea al impedir la interacción con el ligando (15).

Recientes estudios realizados por nuestro grupo han demostrado la especificidad de las células NK a la hora de reconocer y eliminar las TICs CXCR4+ de osteosarcoma, a través del receptor activador tipo tectina NKG2D. Asimismo, se pudo comprobar que la citotoxicidad aumentaba cuando las células NK actuaban en combinación con un anticuerpo antiCXCR4 en comparación con células cultivadas con IgG2 inespecífica (lo que indicaría que no es un efecto mediado por ADCC – citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) (16). Partiendo de esta premisa, en el estudio que se propone se evaluará la hipotética sinergia en el efecto antitumoral de las NK junto al anticuerpo antiCXCR4 Ulocuplumab (subclase IgG4).



Evolución de xenosarcoma, sin (derecha) y con tratamiento con células NK (+ IL2). *Fernández et al, 2015.*

2. OBJETIVO Y UTILIDAD DEL PROYECTO:

Por un lado, se pretende estudiar la relación entre la expresión del receptor de quimioquinas CXCR4 en muestras de sarcoma (osteosarcoma, sarcoma de Ewing, y rabdomiosarcoma) de pacientes diagnosticados y/o tratados en la Unidad de Hemato-Oncología del Hospital Infantil La Paz, y la respuesta al tratamiento en términos de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.

Por otra parte, se pretende evaluar la sinergia entre la terapia celular con NK y la inmunoterapia con el anticuerpo monoclonal antiCXCR4 (Ulocuplumab) (independiente de la citotoxicidad mediada por anticuerpos - ADCC) como efectores antitumorales y a la hora de impedir la aparición de metástasis en sarcomas.

La meta final del estudio es aportar datos que permitan el desarrollo de un ensayo clínico que pudiera evaluar la efectividad del uso de Ulocuplumab en combinación con la terapia con células NK para el tratamiento y prevención de las metástasis en pacientes pediátricos y adultos jóvenes afectados de sarcomas.

3. MATERIAL Y MÉTODO:

→ Estudio retrospectivo:

Se estudiará la expresión de CXCR4 en muestras procedentes de biopsias de pacientes diagnosticados de osteosarcoma, rhabdomyosarcoma y sarcoma de Ewing en la Unidad de Hemato-Oncología Pediátrica del Hospital Infantil La Paz de Madrid desde el año 1995, previa firma para su utilización con el citado objetivo del correspondiente consentimiento informado por parte del paciente y/o sus padres/tutores legales. Se emplearán muestras embebidas en parafina para determinación mediante técnicas de inmunohistoquímica de la presencia y grado de expresión de CXCR4. Asimismo, se recogerán datos referentes a la respuesta del tumor al tratamiento recibido, la presencia de metástasis, y la supervivencia.

→ Líneas celulares:

Se utilizarán líneas celulares primarias de osteosarcoma humano, procedentes de hueso y de metástasis óseas/pulmonares (143B, 595M, 531MII, 588M y 716M,); línea A4573 (sarcoma de Ewing); líneas A673 (sarcoma) y RH30 de rhabdomyosarcoma alveolar; y línea celular de NK NK92MI.

→ Anticuerpos y análisis por citometría de flujo:

Se utilizarán los siguientes anticuerpos monoclonales contra antígenos humanos unidos a fluorocromo (Mabs): CD56-APC (clon NACM16.2), CD16 APC-Cy7 (clon 3G8), CD45-FITC (clon MEM-28), CD19-PE (clon J33), CD20-PE (clon B9E9), CD3-PE-Cy7 (clon UCHT1), CD117 (c-kit)-APC (clon 104D2), Stro-1-FITC (clon Stro-1), CD184 (CXCR4)-APC (clon 12G5). Se utilizará asimismo anticuerpo monoclonal IgG1 antiNKG2D de ratón (clon 1D11), a concentración de 10 mcg/mL. Los análisis de citometría de flujo se realizarán en FACSCanto II (de Becton Dickinson). El ratio de intensidad media de fluorescencia (MFI) se calculará por MFI de la tinción relativa específica respecto a MFI de la tinción del isotipo control. Los datos serán procesados mediante el software FlowJo v10. Ulocuplumab/BMS936564, anticuerpo monoclonal humano IgG4 antiCXCR4, será aportado por Bristol-Myers Squibb.

→ Ensayos de citotoxicidad *in vitro*:

La citotoxicidad contra las células de sarcoma será evaluada a diferentes ratios Efectora-Diana o Effector-Target (E:T) mediante ensayos convencionales de liberación de europium-TDA de 4 horas (Perkin-Elmer, Wallac Turku, Finland).

→ Ensayos de formación de esferas:

Se evaluará en primer lugar la habilidad de las células de sarcoma para crecer formando esferas, cultivándolas en medios enriquecidos sobre placas de fijación ultrabaja. Los marcadores de células iniciadoras de tumor (TICs) (c-Kit, CD133, Stro-1) y el marcador CXCR4 se analizarán mediante citometría de flujo.

Para evaluar la capacidad de ulocuplumab y de las células NK a la hora de reducir el compartimiento de TICs, se cultivarán las esferas obtenidas de las distintas líneas celulares con dicho anticuerpo y con células NK (juntos y por separado) durante 4 y 24 horas, analizando después el porcentaje de expresión de c-kit y de CXCR4 por parte de las células mediante citometría de flujo. Por su parte, para evaluar la capacidad del tratamiento combinado con ulocuplumab y NK a la hora de impedir la formación de esferas por parte de las células tumorales, alguna de estas líneas (aún por determinar) será transducida con un vector lentiviral que codifique GFP (green fluorescent protein). A continuación se cultivarán las células obtenidas (GFP +) con ulocuplumab, células NK, y con ambos, durante 4 y 24 horas, tras las cuales se estudiará la expresión de GFP. Se incubarán en un medio de sarcosferas a una concentración de 1×10^5 cél/mL, y tras 7 días se contabilizarán las esferas.

→ **Ensayos de quimiotaxis:**

Para realizar los ensayos de quimiotaxis, se utilizarán placas transwell ChemoTx de 96 pocillos (6 mm de diámetro, poros de 8 μ m). Se añadirá en cada pocillo un medio con distintas concentraciones celulares y distintas concentraciones de CXCL12, para determinar la capacidad de migración celular en función de la variación de dichas condiciones a las 4 y a las 24 horas. Cada experimento se llevará a cabo por triplicado. Posteriormente, se repetirán los experimentos añadiendo ulocuplumab y células NK, en combinación y por separado.

→ **Modelo de xenosarcoma:**

Para la generación de un modelo ortotópico de osteosarcoma, se inyectará un total de 5×10^5 células de la línea 531MII en la esponjosa de ambas tibias de ratones de 10-12 semanas de edad NOD/SCID. Dichos ratones serán tratados con ulocuplumab y células NK por separado y en combinación, registrándose los datos de supervivencia y de volumen tumoral desarrollado en las distintas condiciones, recogiendo muestras de tibia y pulmón que serán fijadas e incluidas en parafina, para descartar la presencia de micrometástasis pulmonares (mediante tinción con H&E). Los experimentos se repetirán dos veces esta vez para la confirmación de los resultados.

4. RESULTADOS ESPERABLES.

Se estima un plazo para el desarrollo de los experimentos *in vitro* de aproximadamente 12-15 meses, y 6-9 meses para el desarrollo del modelo *in vivo*. En los últimos 3 meses se realizará el análisis de los datos con el objetivo de escribir una publicación, tesis doctoral y poner las bases para escribir un ensayo clínico.

5. BIBLIOGRAFÍA:

1. Rueda P et al. The CXCL12 gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS ONE* .2008. 3(7):e2543.
2. Kuhne MR et al. BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in vivo in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2013 Jan 15;19(2):357-66.
3. Bleul CC, et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). 1996 Sep 1;184(3):1101-9.
4. Guleng B, et al. Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res*. 2005 Jul 1;65(13):5864-71.
5. Laverdiere C, et al. (2005) Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behaviour and outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 11(7):2561–2567.
6. Brennecke P et al. CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice. *Clin Exp Metastasis*. 2014 Mar;31(3):339-49.
7. Kashima K et al. Inhibition of metastasis of rhabdomyosarcoma by a novel neutralizing antibody to CXCR4 chemokine receptor-4. *Cancer Sci*. 2014 Oct;105(10):1343-50.
8. Siclari VA et al. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *J Orthop Surg Res*. 2010 Oct 27;5:78.
9. Gibbs CP et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*. 2005 Nov;7(11):967-76.
10. Perissinotto E et al. Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):490-7.
11. San-Miguel T et al. Expression of the Chemokine Receptors CXCR3, CXCR4, CXCR7 and Their Ligands in Rhabdomyosarcoma. *Pathol Oncol Res*. 2015 Sep;21(4):1191-9.
12. Kiessling R et al. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*. 1975 Feb;5(2):117-21.
13. Imai, K et al. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795–1799.
14. Carrega, P. et al. (2008). Natural killer cells infiltrating human non-small-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 112, 863–875.
15. Mayol K et al, Biajoux V. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking. *Blood*. 2011 Nov 3;118(18):4863-71.
16. Fernández L. et al. Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. *Cancer Lett*. 2015 Nov 1;368(1):54-63.



Hospital Universitario La Paz
Fundación para la Investigación Biomédica
Comunidad de Madrid



ANEXO II

DATOS DE LA ENTIDAD RECEPTORA DE LA COLABORACIÓN:

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO LA PAZ

DIRECCIÓN: Pº CASTELLANA, 261, 2806 MADRID

TELÉFONO: 91 727 75 76

C.I.F: G 83727057

Nº DE CUENTA IBAN: ES47 2100 4065 1322 0009 2143 (Entidad CaixaBank)

DISTRIBUCIÓN DE PAGOS

Los pagos se efectuarán directamente a la entidad receptora de la colaboración mediante transferencia bancaria en base al siguiente calendario:

Aportación de €15 .000.-	15 de Marzo de 2016
Aportación de € 15.000.-	1 de Septiembre de 2016
Aportación de € 15.000	1 de Marzo de 2017
Aportación de € 15.000.-	1 de Septiembre de 2017