

## PRESENTACIÓN PROYECTO

- [Generalidades](#)
- [Grupos](#)
- [Palabras Claves](#)
- [Zonas Estudio](#)
- [Entidades](#)
- [Entidades General](#)
- [Descripciones](#)
- [Cronograma](#)
- [Impactos](#)
- [Coberturas](#)
- [Productos](#)
- [Personal](#)
- [Rubros](#)
- [Rubros Entidad](#)
- [Detalles Rubros](#)
- [Rubros por Año](#)
- [Contrapartida](#)

## Generalidades

<b>Código Registro:</b>	58253				
<b>Título:</b>	Estudio clínico Fase I de inmunoterapia con vacunas sintéticas personalizadas en pacientes con cáncer de mama triple negativo				
<b>Convocatoria:</b>	777-2017 CONVOCATORIA PARA PROYECTOS DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN SALUD 2017				
<b>Programa Nacional de CTel:</b>	PROGRAMA NACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN SALUD				
<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA				
<b>Categoría:</b>	Desarrollo tecnológico				
<b>Área Conocimiento:</b>	Biotecnología en Salud				
<b>Linea Tematica:</b>	CONDICIONES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES.				
<b>Tipo:</b>	Proyecto				
<b>Tipo Financiación:</b>	RECUPERACIÓN CONTINGENTE		<b>Lugar Ejecución:</b>	BOGOTA D.C. - BOGOTÁ, D.C.	
<b>Duración en Meses:</b>	36		<b>Ejecución Cronograma en:</b>	Meses	

## Grupos

Código	Nombre	Entidad	Clasificación	Número de Resolución	Año de Resolución
COL0100636	Inmunología y Medicina Traslacional	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	B	379	2016
COL0128092	GESTION SANITARIA	SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE	D	001	2011
COL0103772	Grupo de Investigación en Inmunología y Oncología	FUNDACION SALUD DE LOS ANDES			

## Palabras Claves

- ♦ INMUNO-MONITOREO
- ♦ VACUNAS PERSONALIZADAS
- ♦ BIO-MARCADORES
- ♦ MUTACIONES TUMORALES
- ♦ VACUNAS SINTÉTICAS
- ♦ INMUNOTERAPIA
- ♦ CÁNCER

## Entidades

Nombre Entidad	Rol
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	EJECUTOR
SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE	COEJECUTOR
FUNDACION SALUD DE LOS ANDES	COEJECUTOR

## Entidades General

### UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

<b>Nit:</b>	899999063	<b>Digito de Verificación:</b>	3
<b>Ciudad:</b>	BOGOTÁ, D.C.		
<b>Dirección:</b>	CR 45 26-85 Ed. Uriel Gutierrez Piso 5	<b>Fax:</b>	
<b>Página Web:</b>		<b>Email:</b>	vicinvest_nal@unal.edu.co

#### Representante Legal

<b>Nombre:</b>	Ignacio Mantilla Prada		
<b>Tipo Identificación:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Numero Identificación:</b>	19328350

#### Primer Contacto

<b>Nombre:</b>	Carmen María Romero Isaza	<b>Cargo:</b>	Vicerrectora de Investigación
<b>Teléfono Contacto:</b>	3165000 ext. 18552	<b>Email:</b>	vicinvest_nal@unal.edu.co

#### Clasificación

<b>Sector:</b>	EDUCATIVO		
<b>Dirección:</b>	CR 45 26-85 Ed. Uriel Gutierrez Piso 5	<b>Teléfono:</b>	3165000
<b>Tipo Entidad:</b>	UNIVERSIDAD PUBLICA	<b>Tipo Empresa:</b>	
<b>Naturaleza Juridica:</b>		<b>Tamaño:</b>	GRANDE

#### Información Adicional

<b>Exporta:</b>	No	<b>Matrícula Cámara:</b>	
<b>Fecha Constitución:</b>		<b>Activo total último año:</b>	

### SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE

<b>Nit:</b>	900958564	<b>Digito de Verificación:</b>	9
<b>Ciudad:</b>	BOGOTÁ, D.C.		
<b>Dirección:</b>	Transversal 44 No. 51 B - 16 Sur	<b>Fax:</b>	
<b>Página Web:</b>	http://www.subredsur.gov.co/	<b>Email:</b>	js.nestor@gmail.com

#### Representante Legal

<b>Nombre:</b>	CLAUDIA HELENA PRIETO VANEGAS		
<b>Tipo Identificación:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Numero Identificación:</b>	39684325

### Primer Contacto

**Nombre:** NESTOR SUAREZ **Cargo:** Profesional especializado gestión de conocimiento  
**Teléfono Contacto:** 3124912939 **Email:** js.nestor@gmail.com

### Clasificación

**Sector:** PÚBLICO  
**Dirección:** Transversal 44 No. 51 B - 16 Sur **Teléfono:** 4852540  
**Tipo Entidad:** ENTIDADES GUBERNAMENTALES **Tipo Empresa:**  
**Naturaleza Jurídica:** **Tamaño:** GRANDE

### Información Adicional

**Exporta:** No **Matrícula Cámara:**  
**Fecha Constitución:** **Activo total último año:**

## FUNDACION SALUD DE LOS ANDES

**Nit:** 830113789 **Digito de Verificación:** 9  
**Ciudad:** BOGOTÁ, D.C.  
**Dirección:** Calle 44 # 58-05 **Fax:**  
**Página Web:** <http://www.fsa.com.co/> **Email:** secretariagerencia@saluddelosandes.com

### Representante Legal

**Nombre:** Fabio Mendez  
**Tipo Identificación:** CEDULA DE CIUDADANIA **Numero Identificación:** 19392562

### Primer Contacto

**Nombre:** FABIO MENDEZ **Cargo:** Gerente  
**Teléfono Contacto:** 3114620248 **Email:** fmendez@saluddelosandes.com

### Clasificación

**Sector:** PRIVADAS SIN ÁNIMO DE LUCRO  
**Dirección:** Calle 44 # 58-05 **Teléfono:** 320 273 5366  
**Tipo Entidad:** FUNDACIONES, ASOCIACIONES PROFESIONALES, ONGS **Tipo Empresa:**  
**Naturaleza Jurídica:** **Tamaño:**

### Información Adicional

**Exporta:** No **Matrícula Cámara:**  
**Fecha Constitución:** **Activo total último año:**

## Descripciones

### **CONFORMACIÓN Y TRAYECTORIA DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN SOLICITANTE EN LA TEMÁTICA ESPECÍFICA DEL PROYECTO**

El equipo de investigación del presente proyecto es liderado por el Dr. Carlos Alberto Parra-López, profesor titular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, investigador senior del grupo de Colciencias “Grupo de Investigación en Inmunología y Medicina Traslacional” (COL0100636). A este grupo pertenecen un oncólogo (Dr. Rafael Tejada) y un cirujano oncólogo (Dr. Ramiro Sánchez) quienes facilitarán desde el Hospital Universitario Nacional (HUN) y la Clínica del Seno el acceso a pacientes y su control clínico. Por otra parte, está el grupo médico del Hospital El Tunal (SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE), quienes a través del grupo de Gestión Sanitaria (COL0128092) que incluye la participación de una mastóloga (Dra. Ana María Mejía), un patólogo (Dr. Rene Burgos) y un epidemiólogo (Dr. Néstor Suarez) quienes apoyarán el proceso de vinculación de pacientes desde el Hospital El Tunal con su respectivo seguimiento y análisis de datos obtenidos en el proceso de monitorización de las pacientes. El análisis bioinformático para la predicción de péptidos inmunogénicos será dirigido por el profesor Luis Fernando Niño, con el apoyo y asesoría de la Universidad de Washington en St. Louis y del profesor Jovanny Zabaleta de la Universidad de Luisiana experto en ciencias ómicas (Ver Anexo cartas de apoyo). Por otra parte, la Fundación Salud de los Andes mediante persigue dar continuidad a la alianza con la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional iniciada hace 8 años en cuyo marco se ha venido desarrollando el primer Estudio Clínico Fase I en Colombia de inmunoterapia en pacientes con cáncer de mama utilizando células dendríticas autólogas como vacuna el cual ha permitido demostrar: (i) la seguridad del uso de células dendríticas para su uso en la inmuno-terapia de pacientes con cáncer; (ii) la formación como investigadores hasta el momento de 10 estudiantes de semilleros de investigación; cinco estudiantes de tesis de Maestría y uno de Doctorado quienes han publicado cuatro artículos científicos en revistas internacionales indexadas. Este proyecto fue aprobado en la convocatoria de Colciencias número 502 del año 2010, que con el grupo de investigación en Inmunología y Oncología (COL0103772) dirigido por el Dr. David Bernal, candidato a PhD en el programa de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional (bajo la dirección del Dr. Carlos A. Parra), han adelantado la evaluación de la seguridad del uso de estas células en pacientes con cáncer de mama ductal in situ y que permitió establecer un modelo de evaluación de la respuesta inmune en pacientes que ingresan a este esquema de quimioterapia (A/C) – inmunomonitorio – el cual evidencia como esta quimioterapia restablece la capacidad funcional del sistema inmune (Linfocitos T y células dendríticas) [1, 2]. El Dr. David Bernal (líder del grupo de Investigación en Inmunología y Oncología Clínica - GIIOC) es graduado en Medicina de la Universidad Nacional de Colombia año 2007 y realizó su año de Internado en investigación en la Universidad Nacional de Australia, Laboratorio John Curtin School of Medical Research y está vinculado al Grupo de Investigación de la Fundación Salud de los Andes desde hace 9 años; actualmente el Dr. Bernal es candidato a doctor en Ciencias Biomédicas en la Universidad Nacional de Colombia bajo la Dirección del Profesor Carlos Parra y cuenta con el patrocinio de la Fundación Salud de los Andes . Recientemente ha publicado artículos relacionados con el monitoreo de pacientes con cáncer de mama por citometría de flujo. Los trabajos de investigación del grupo han sido presentados en diversos congresos nacionales e internacionales los cuales han sido premiados y publicados en distintas ocasiones (Ver soportes anexos) [3, 4]. La Fundación Salud de los Andes, es una entidad privada sin ánimo de lucro, líder en salud, que

cuenta con un equipo de personal en salud interdisciplinario, que trabaja en diferentes áreas de atención médica. Uno de los proyectos bandera contemplado en el plan de desarrollo de la Fundación Salud de los Andes, es la inversión en programas de investigación de medicina traslacional. En este sentido, la compañía ha incursionado en la búsqueda de nuevas alternativas de manejo terapéutico del cáncer, explorando inicialmente algunas modalidades de terapias biológicas. Para este fin, la Fundación ha conformado el Grupo de Investigación en Inmunología y Oncología (GIIOC), responsable de desarrollar el proyecto TEBICA (Terapias Biológicas en Cáncer), en desarrollo de un convenio marco suscrito con la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia -Sede Bogotá-. El grupo ha venido adelantando ensayos clínicos y pre-clínicos enfocados a la futura realización de este proyecto como se verifica en los resultados preliminares (Ver documentos anexos), en los que ha puesto a punto la derivación de DCs y los ensayos concernientes a la evaluación del perfil inmunológico, de los cuales se tienen a punto los Procedimientos Operativos Estándar (POEs) respectivos.

---

## RESUMEN EJECUTIVO

La investigación en cáncer en países desarrollados permite avizorar que varios tipos de cáncer en estado avanzado, serán en el mediano plazo enfermedades tratables. El descubrimiento de nuevas terapias son el producto del desarrollo alcanzado de la Medicina Traslacional (los hallazgos del laboratorio que se traducen en el corto plazo en beneficios para el paciente), un nuevo enfoque de medicina aplicada liderada por investigadores en las universidades en alianza con el sector productivo quienes adelantan estudios clínicos. A pesar de los avances de la Medicina Traslacional en el mundo desarrollado en nuestro medio esta tiene un desarrollo incipiente. Por su inestabilidad genética, el cáncer de mama triple negativo – (CMTN) (ER-, PR-, Her2/neu-) entre otros tumores presentan un alto número de mutaciones que probablemente los hace resistentes a regímenes de quimio/radioterapia generando una alta morbi-mortalidad. Además la inestabilidad genética contribuye no solo a la inmuno-edición de estos tumores [5] sino a la generación de un micro-ambiente tumoral supresor [6], dos factores que contribuyen al escape de estos tumores a su inmuno-vigilancia [7, 8]. Sin embargo, logros recientes sugieren que estos factores son controlables utilizando la medicina personalizada. Mientras la inmuno-supresión es modulada con el uso de anticuerpos anti-puntos de control (“anti-check points” como anti-CTLA4, anti-PD1 y anti-PDL-1) [9], la inestabilidad genética puede ser el tendón de Aquiles de estos tumores. Estudios clínicos fase I de pacientes con melanoma y cáncer de pulmón metastásico tratados con Ipilimumab (anti-CTLA4) - para disminuir la inmuno-supresión - péptidos presentados en moléculas MHC I del propio tumor que contienen mutaciones, son reconocidos por LT-CD8 como extraños y destruyen el tumor de manera eficiente al ser utilizados como vacuna [10-13]. Por esta razón la identificación de mutaciones no sinónimas de un solo aminoácido y la vacunación con péptidos de 25 amino ácidos que incorporan estas mutaciones (vacunas sintéticas), se perfila como alternativa para la inmunoterapia del cáncer [10-13]. En una aproximación que toma 8 semanas, hoy es posible ir desde el análisis del transcriptoma del tumor para identificar el universo de mutaciones del tumor hasta la vacunación del paciente con un péptido que contiene una mutación, con resultados de respuesta clínica importantes no alcanzados hasta ahora en pacientes con melanoma y carcinoma de células no pequeñas del pulmón metastásicos [10-13]. Por lo anterior, proponemos la realización del primer estudio clínico en Colombia de vacunación de pacientes con CMTN empleando péptidos sintéticos que contienen mutaciones del propio tumor que serán presentados por células dendríticas autólogas con el fin de evaluar la inmunogenicidad y seguridad de este tipo de vacuna personalizada. El alcanzar los objetivos específicos planteados en este proyecto, significará que hemos validado en Colombia el diseño experimental necesario para identificar epítopes exclusivas en cada tumor de las participantes en el estudio además de demostrar la seguridad e inmunogenicidad de estas

vacunas. Logrado lo anterior habremos dado un importante paso hacia la implementación en nuestro país del uso de este tipo de vacuna para la inmunoterapia no solo de CMTN sino de otros tumores como glioblastoma, gástrico, esófago y páncreas altamente mortales. Este proyecto adelantado por la Universidad Nacional, el Hospital El Tunal de Bogotá y la Fundación Salud de los Andes, cuenta con la colaboración del Profesor Jovanny Zabaleta experto en ciencias “ómicas” de la Universidad de Louisiana; cuenta con la asesoría del Dr. Pedro Romero de la Universidad de Lausana (Suiza) quien tiene amplia experiencia en ensayos clínicos de inmunoterapia de pacientes con melanoma con péptidos sintéticos como vacuna y con investigadores del Grupo de Investigación en Inmunología y Oncología Clínica (GIIOC) de la Fundación Salud de los Andes.

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El avance de la investigación traslacional en cáncer adelantada en países desarrollados permite avizorar que en estos países varios tipos de cáncer serán en el mediano plazo enfermedades tratables. Producto de este tipo de investigación, varios tipos de terapia personalizada brindan hoy en día a pacientes con cáncer avanzado la oportunidad de tener periodos libres de enfermedad de varios años sin comprometer su calidad de vida por la alta especificidad de estos tratamientos. Estos avances en nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer en el mundo desarrollado producto de la investigación traslacional contrasta con el rezago que en materia de Medicina Traslacional en cáncer tiene nuestro país y con el hecho de que en nuestro medio la incidencia de cáncer va en aumento y este continúa siendo una de las principales causas de muerte en la población general. El cáncer de mama triple negativo es una de las principales causas de muerte de mujeres en Colombia. La alta morbilidad-mortalidad por cáncer en nuestro medio es atribuida a la falta de alternativas terapéuticas para el tratamiento de este tumor. Con miras a superar lo anterior, en el marco del presente proyecto presentado a la Convocatoria 777 de Colciencias (modalidad desarrollo tecnológico), un grupo de investigadores clínicos y en ciencias básicas que contará con el acompañamiento de expertos extranjeros y la participación de una empresa del sector productivo adelantaremos un estudio clínico piloto en pacientes con cáncer de mama triple negativo que serán vacunadas con péptidos sintéticos que poseen mutaciones del tumor para demostrar que en nuestro medio es posible implementar el uso de vacunas sintéticas personalizadas para el tratamiento de cánceres responsables de alta mortalidad en Colombia. Por lo anterior en este proyecto perseguimos resolver la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible el diseño de vacunas sintéticas personalizadas específicas contra células tumorales a partir de neoepitopes en pacientes con cáncer de mama triple negativo?

---

## JUSTIFICACIÓN

En países desarrollados la inmunoterapia del cáncer ha logrado avances en el control del cáncer. En estos países la efectividad y alta especificidad de distintas estrategias de inmunoterapia ofrece alternativas terapéuticas que aumentan las expectativas y calidad de vida de pacientes con cáncer incluso aquellos con enfermedad en estado avanzado de metástasis. Uno de los avances más recientes de la medicina personalizada en cáncer consiste en la vacunación con células dendríticas autólogas pulsadas con péptidos sintéticos que comprenden mutaciones puntuales de células tumorales los cuales son administrados como vacuna terapéutica personalizada con muy buenos resultados. Debido a que la posibilidad de identificar antígenos mutados en los tumores



es favorecida por la alta tasa de mutaciones del tumor, tumores con una alta inestabilidad genética como el CMTN que producen las tasas más altas de mortalidad por su resistencia al tratamiento y recaídas más tempranas son los blancos principales de este tipo de vacuna terapéutica personalizada. Durante los últimos años en el grupo de investigación hemos adelantado la evaluación de la seguridad e inmunogenicidad del uso de células dendríticas autólogas en pacientes con cáncer de mama, y hemos podido demostrar que su administración a las pacientes es segura ya que no genera efectos adversos serios ni severos. En casos como el CMTN, las alternativas terapéuticas desarrolladas en los últimos 50 años ha sido limitada y si bien responden tempranamente a regímenes de quimioterapia los porcentajes de recaída a cinco años es cerca del 70% la supervivencia libre de enfermedad de estas pacientes es muy baja; por lo anterior y por ser uno de los tumores con alta carga mutacional, el CMTN brinda una oportunidad para implementar en su manejo la aplicación de vacunas sintéticas personalizadas. Por las respuestas clínicas favorables observadas en pacientes con otros tipos de tumores altamente agresivos como melanoma y cáncer de pulmón cuando son tratados con este tipo de vacuna, consideramos que el implementar en nuestro medio la producción de este tipo de vacuna representará un importante avance para el manejo de pacientes con CMTN lo cual tendría un importante impacto social y económico reflejado en calidad de vida y años de vida recuperados para mujeres cuya morbilidad afecta la estabilidad del hogar e impacta el sistema de atención en salud de estas pacientes debido a los altos gastos del cuidado paliativo de estas pacientes en procesos de recurrencia y metástasis. Además la implementación de la metodología para lograr este tipo de vacunas posibilitaría en un futuro cercano su uso para el manejo de otros tumores altamente mortales debido a su alta inestabilidad genética como el cáncer de páncreas, de esófago y el glioblastoma.

---

## MARCO CONCEPTUAL

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de seno es el segundo cáncer con mayor incidencia en el mundo y el quinto en mortalidad, y se proyecta que para el 2020 ambas tasas aumenten en un 50% [14]. Para las ciudades de América Latina, el cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor recurrencia y representa la mayor causa de muerte por cáncer entre las mujeres [15]. En Colombia, la tasa de incidencia de este cáncer en mujeres es del 23.4% y la tasa de mortalidad del 13.9% según el último reporte de Globocan en 2012. Sin embargo, se espera que el incremento de la incidencia en países en vía de desarrollo supere lo proyectado a nivel global. Las estadísticas previamente descritas corresponden a todos los tipos de cáncer de mama, pero esta enfermedad, al ser altamente heterogénea, ha sido clasificada en varios subtipos. Dentro de los principales subgrupos identificados por medio de estudios genómicos se encuentran: los subtipos Luminal A y B, el “basal-like”, el Her2 positivo, y el triple negativo (CMTN) [16]. Este último subtipo se define por la ausencia de receptores de estrógeno, receptores de progesterona, y la ausencia de la sobreexpresión de HER2. El CMTN representa el subtipo de peor pronóstico debido al poco conocimiento que se tiene sobre el manejo del mismo, no existen guías de manejo consensuadas lo que origina un arsenal de regímenes de quimioterapia no efectivas para prevenir las recaídas. Intensas investigaciones se han centrado en la búsqueda de blancos específicos con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento para la enfermedad sistémica. Actualmente, el protocolo utilizado para el tratamiento de este subtipo de cáncer es el uso de terapias adyuvantes y neoadyuvantes, las cuales incluyen antraciclina, ciclofosfamida, y taxanos [17, 18]. El CMTN ha empezado a ser objeto de investigación en los últimos años, ya que representa aproximadamente un 15% de todos los cánceres de mama y se caracteriza por una corta supervivencia y un pico temprano de recurrencia tres años después del diagnóstico y tratamiento. La mayoría de muertes (superior al 70%) ocurren dentro de los primeros 5 años seguidos al diagnóstico inicial, ya que este subtipo de



cáncer presenta un comportamiento clínico agresivo, con un alto riesgo de recaída local o distante que frecuentemente representa metástasis visceral y/o cerebral [17, 18]. Además, estudios epidemiológicos han reportado que este subtipo es el más frecuente en mujeres de 40 años y en mujeres con mutaciones en el gen BRCA172 en la línea germinal, así como una alta asociación con mujeres de raza negra y etnia hispana [18]. Paradójicamente a diferencia de otros subtipos de cáncer de mama como los subtipos positivos para receptores de hormonas, el CMTN es considerado “inmunogénico” por el contenido de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) reportado en diferentes estudios [19-21]. Esta inmunogenicidad probablemente esté asociada a una elevada tasa de mutaciones somáticas de las células tumorales promovida por la alta inestabilidad genética del CMTN [22]. Lo anterior probablemente produce un alto número de neo-epítopes susceptibles de ser reconocidos por TILs. A pesar de que dentro del cáncer de mama el CMTN sea el subtipo de cáncer de mama con mayor grado de TILs, la frecuencia de estas células es baja en comparación a otros tumores inmunogénicos, por lo que el uso de estrategias de inmunoterapia como anticuerpos anti puntos de control quizás mejore el desempeño como células anti-tumorales de TILs en CMTN. Por su parte estrategias de tratamiento que mejoren el aumento de linfocitos T en el infiltrado tumoral quizás se logre en el infiltrado que permitan mejorar la respuesta anti-tumoral de TILs en el tumor de estas pacientes [18]. Dentro de las inmunoterapias utilizadas para explotar la aparición de neo-epítopes producto de las alteraciones somáticas de tumores con altas tasas de mutación, como melanoma [23], carcinoma de células no pequeñas de pulmón [24] y cáncer colorrectal [25], se encuentra el uso de fármacos anti “check-point”, que se encargan de bloquear la acción de proteínas inhibitorias como CTLA-4, PD-1 y PDL-1. Acompañando este tipo de tratamientos, la implementación de vacunas con células dendríticas pulsadas con lisados tumorales, proteínas altamente expresadas por el tumor, o péptidos sintéticos ha probado incrementar la frecuencia y variedad de TILs post-quimioterapia, así como una favorable respuesta clínica [26-29]. Dentro de las inmunoterapias propuestas para mejorar el número y respuesta de los TILs en varios modelos de cáncer, la que mejor respuesta clínica es la quimioterapia neo-adyuvante (NAC). Este tipo de medicamento se ha vuelto estándar en el tratamiento de cáncer de seno avanzado [30] a razón de la capacidad que tiene de atacar el microambiente metastásico en fases temprana. Además, NAC provee la valiosa posibilidad de obtener información de la respuesta del tumor in vivo, así como la biología de la enfermedad a través de la evaluación de biomarcadores, al facilitar la obtención de múltiples muestras del tumor. Varios grupos han demostrado la importancia de NAC en la modulación del microambiente tumoral hacia una inmunidad antitumoral al aumentar el radio de TILs/T reguladoras [31], así como el número de células CD60low en los infiltrados tumorales [32]. Por su parte, NAC no solo promueve la infiltración de TILs al microambiente tumoral, sino que también se ha encontrado que el inmunofenotipo de estos TILs es predominantemente CD8+GranzimaB+ [33]. Acompañando esta respuesta del componente T, las células APC también se ven beneficiadas por el uso de NAC debido a que hace que las células tumorales empiecen a emitir señales de peligro y las conduce a un programa de muerte celular inmunogénica que estimulan la respuesta inmune innata y consecuentemente la respuesta adaptativa (Referencia review). Todo esto en conjunto sugiere que el uso de NAC corresponde al tratamiento con mejor pronóstico para las pacientes con CMTN. Las células dendríticas representan la conexión entre el sistema inmune innato con el adaptativo, y son consideradas las células presentadoras de antígeno profesionales por excelencia [29]. Desde la descripción inicial de las células dendríticas (DC) hace más de 50 años [34], su papel en la inmunidad mediada por células T en la inmunidad antitumoral ha sido ampliamente estudiado [29]. La posibilidad de diferenciar grandes números de DC a partir de monocitos las convierte en una herramienta importante en la terapia de pacientes con cáncer. Su uso como vacuna ha demostrado que son seguras y capaces de provocar respuestas clínicas favorables, lo que ha promovido su uso actual como vacuna en cientos de estudios clínicos en pacientes con cáncer en fases I-IV. Sipuleucel- T (Provenge) una vacuna basada en células dendríticas pulsadas con un antígeno de próstata fue aprobada en el año 2010 por la FDA para el tratamiento de cáncer de próstata refractario a otros tratamientos [35, 36]. Este avance supone una primera línea guía para el desarrollo y regulación de nuevas estrategias y ensayos clínicos

venideros que comprenderán la nueva generación de inmunoterapias personalizadas [29, 37]. Esta estrategia tiene como objetivo la recuperación de la falta de respuesta del sistema inmunológico promovido por el microambiente tumoral que termina con el restablecimiento de la capacidad antitumoral de células T citotóxicas (CTL) [27, 28, 38-42]. La caracterización del fenotipo de las DCs derivadas de monocitos después de la maduración continúa siendo una valiosa herramienta para examinar in vitro los beneficios potenciales de estas células en la generación de inmunidad protectora contra tumores en pacientes con cáncer. En los seres humanos, hay dos grupos de DC primarias, las de origen mielóide caracterizadas por la expresión de CD11c y CD33 (se encuentran principalmente en la dermis en tejidos y circulantes en sangre), y las DC de linaje linfóide o plasmacitoides que expresan CD123 y CD45RA (circulantes en sangre). En pacientes con cáncer se ha observado una reducción del número de DC mieloides en sangre periférica e infiltrantes de tumores, mientras que el número de DC plasmacitoides no se ve alterada. Adicional a la alteración en la cantidad de células, las DC mieloides en pacientes con cáncer tienen un fenotipo inmaduro [43, 44] que favorece un proceso de tolerancia inmune dentro del microambiente tumoral [45, 46]. Por lo tanto, el uso de las vacunas basadas en DC mieloides se ha explorado activamente durante los últimos años para superar tanto la mala presentación de los antígenos tumorales por las células tumorales, así como la baja funcionalidad de las DC primarias en los pacientes con cáncer (15). La capacidad de DC para activar células T capaces de reconocer y destruir células tumorales de una manera antígeno específica ha sido demostrada en protocolos clínicos llevados a cabo en pacientes con cáncer en los que DCs pulsadas con antígenos tumorales se han utilizado como vacunas [47]. Este tipo de tratamiento ha probado ser seguro y más tolerable que otros tratamientos como la quimioterapia o la radioterapia [37], con respuestas clínicas e inmunológicas variables [25, 39, 48, 49]. Debido a que las DCs están en una cantidad muy baja en sangre periférica, durante la última década se han descrito varios métodos para su generación in vitro a partir de monocitos de sangre periférica cultivados con IL-4 y GM-CSF y madurados con diversas combinaciones de citoquinas proinflamatorias en combinación con agonistas de receptores tipo Toll (Toll-like Receptors-TLRs) [50]. La mayoría de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han utilizado DCs derivadas de monocitos generadas en siete días (7d-DC): cinco días en presencia de GM-CSF e IL-4, seguido por la adición de los estímulos de maduración durante los últimos dos días del cultivo. Además, hay algunos informes que proponen la generación de DCs en un período de tiempo más corto: la inducción de DCs a partir de monocitos tratados con GM-CSF e IL-4 durante 24 horas es seguida por 24 horas de incubación con un estímulo proinflamatorio (2d-DCs), tiempo que permite lograr DCs competentes que modulan respuestas inmunes Th1 específicas de antígeno [2, 51, 52]. Por último, una combinación de citoquinas recientemente descrita para la maduración de DCs de 7 días que incluye interferones de tipo I y ligandos de TLR induce DCs maduras caracterizadas por una alta producción de IL-12 y una eficiente activación de células T CD8+ contra tumores denominadas DCs Tipo alfa o alfa-DCs [53]. Por su parte, el agente con el que estas DCs deben ser pulsadas (lisados tumorales, oncopéptidos, péptidos sintéticos) para el desarrollo de las vacunas ha variado en los distintos ensayos clínicos. Los oncopéptidos fueron la primera línea de antígenos con los que se cargaron las DCs debido a que, en el caso de funcionar, podrían ser utilizados de manera generalizada en todos los pacientes que tuviesen el mismo tipo de tumor. Sin embargo, se encontró que este tipo de vacunas contaban con una gran limitación: los linfocitos que tenían una alta afinidad hacia estos péptidos se seleccionaban de manera negativa, por lo que no se encontraban en muestras de sangre tomadas posterior a la vacunación, y aquellas células que pasaran la depleción usualmente tenían un fenotipo regulador [54, 55]. A raíz de lo reportado en estos estudios, los péptidos sintetizados a partir de mutaciones recurrentes en las células tumorales, los cuales proveen antígenos asociados a tumores los cuales son capaces, en modelos animales, de generar una inmunidad contra los mismos tumores luego de ser tratados con quimioterapia, pero sensibles a otros tumores (memoria inmunológica) empezaron a tomar fuerza como agente de carga. Posteriormente, trabajos desarrollados por Rosenberg y colaboradores identificaron linfocitos T específicos a antígenos tumorales de melanoma en pacientes que reaccionaron predominantemente con células de melanoma pero no células

normales, lo que sugiere que los cánceres humanos también poseen antígenos tumorales cuya expresión era o bien tumoral específica o mostraron una expresión limitada en células normales [56]. La mayor limitación de esta opción era la gran dificultad que había en la identificación y posterior síntesis de estos péptidos. Afortunadamente, el desarrollo de herramientas tanto de secuenciación del exoma y transcriptoma, así como de programas bioinformáticos capaces de analizar muestras de gran tamaño y predecir aquellas mutaciones puntuales no sinónimas que fuesen traducidas efectivamente, procesadas por el inmunoproteosoma, presentadas por el complejo mayor de histocompatibilidad, y fueran inmunogénicas en comparación a sus contrapartes nativas han facilitado el progreso de estas vacunas [57-59]. Las técnicas de secuenciación de siguiente generación, como ya se mencionó, permitió la identificación de estas mutaciones somáticas a través de la secuenciación masiva en paralelo (MPS) [60] al comparar el RNA obtenido de tumor con el RNA de fuentes nativas del paciente. Con base en los hallazgos obtenidos con MPS, múltiples librerías genómicas han sido compiladas, lo que supone una gran cantidad de bases de datos que sirven como marco de referencia para estudios en nuevos pacientes. Una vez se han obtenido las secuencias de los tumores y las células normales del paciente, el alineamiento de las secuencias en plataformas MPS y el uso de diferentes programas (Bioedit, Blast, BWA, GATK, Strelka, VarScan) permite la identificación de variaciones únicas de nucleótidos que resulten en mutaciones no sinónimas [11, 23, 24]. Partiendo de estas mutaciones, el siguiente paso consiste en el uso de filtros consecutivos que determinan la afinidad (IC50) con el MHC clase I (MHCI), lo que crea otra limitación dentro de este tipo de estudio, al solo dar respuesta al MHCI, y por ende hablar de una respuesta mediada por linfocitos CD8 citotóxicos (CTL) [61]. El programa más común para realizar este primer filtro es NetMHC [62, 63], seguido por NetChop [64], el cual se encarga de filtrar aquellos péptidos que no vayan a tener un adecuado clivaje por el proteosoma, dejando solo péptidos de buena afinidad con el MHCI que puedan ser presentados adecuadamente a los CTL y generen una buena respuesta inmune. Las estrategias in silico utilizadas para cada una de las condiciones mencionadas previamente han permitido el paso de terapias “compartidas” a acercamientos “completamente personalizados”, que respondan a las particularidades de cada paciente, mejorando la probabilidad de una buena respuesta clínica [59]. Desde el primer reporte en 2012, generado de manera independiente por dos grupos, en donde el uso de estos métodos bio-informáticos fueron validados para la búsqueda de estas mutaciones no sinónimas inmunogénicas [11], estos softwares se encuentran en una constante evolución, mediada principalmente por el uso de redes neuronales artificiales (ANN), los cuales son programas capaces de ser entrenados con las respuestas in vivo que se observen en cada uno de los ítems evaluados para la predicción de neo-antígenos y de esta manera seguir avanzando en el desarrollo de este tipo de inmunoterapia personalizada.

---

## ESTADO DEL ARTE

Los resultados publicados en relación a vacunas personalizadas en cáncer reflejan la evolución de la búsqueda de epítopes eficaces para estimular la respuesta de linfocitos T anti-tumorales iniciada por Boon en 1994 [65] quien fue el primero en demostrar que péptidos presentados en moléculas MHC clase I generan células citotóxicas que rechazan un tumor. Los ensayos pre-clínicos en modelos animales con este tipo de vacunas adelantados por Schreiber y Delamarre [10, 12, 13, 24, 66, 67], permitieron en 2014 demostrar por primera vez dos cosas que no habían podido ser evidenciadas hasta ahora: (i) una epítipe de 9 aminoácidos que contiene una mutación específica de un tumor cuando es utilizada como vacuna terapéutica es suficiente para destruir un tumor ya instaurado en el animal [13, 66] y (ii) cuando esta vacuna es administrada de manera profiláctica esta genera inmunidad contra el tumor en la mayoría de animales vacunados [13]. Si bien el uso de péptidos como vacuna en la inmunoterapia de cáncer se ha intentado por

cerca de 30 años con resultados discretos, hasta ahora se habían utilizado epítopes tumorales nativas como las descubiertas por Boon [65] en los años 90s en su mayoría péptidos propios para los cuales somos tolerantes que generan linfocitos antitumorales de baja avidéz con limitada actividad antitumoral y cuyo uso genera el riesgo de auto-inmunidad. Por años se utilizaron para vacunar péptidos cortos de nueve aminoácidos para vacunar, pero hoy se sabe que estos no son suficientes para generar inmunidad probablemente porque no involucran epítopes CD4. Los trabajos de Melief y col., desde el año 2009 permitieron confirmar las bondades de los péptidos largos los cuales incorporan epítopes CD4 además de para la epítope CD8 en la inmunoterapia de cáncer en pacientes con carcinoma de vulva por HPV-16 [68]. Las vacunas personalizadas basadas en péptidos en cáncer utilizando DCs como adyuvante representan un importante complemento a las vacunas que perseguimos implementar con nuestro trabajo. El uso de DCs como adyuvante en vacunas para pacientes con distintos tipos de cáncer ha sido intentado por 22 años en cientos de estudios clínicos en pacientes con diferentes tipos de tumor lo cual ha demostrado que son seguras y generan respuesta inmune en los pacientes vacunados. La confianza en DCs como adyuvante natural se vio refrendada en 2010 con la aprobación por la FDA de Sipuleucel-T (Provenge) la primera vacuna basada en DCs para la inmunoterapia del cáncer de próstata [35, 36]. A pesar de su amplio uso como adyuvante, la eficacia clínica de DCs pulsadas con péptidos tumorales no ha sido satisfactoria probablemente porque hasta ahora se habían utilizado como vacuna péptidos no exclusivos del tumor. Las vacunas personalizadas específicas utilizando epítopes propias del tumor la utilización de DCs pulsadas con péptidos mutados seleccionados a la medida del HLA del paciente representarán un avance significativo de los resultados de este tipo de vacuna como ya ha sido demostrado por Carreno y col., en Washington University quien utilizó péptidos exclusivos de tumor seleccionados mediante la estrategia que será utilizada por nosotros para la inmunoterapia de pacientes con melanoma metastásico con resultados sorprendentes [10]. Finalmente, los buenos resultados de las vacunas personalizadas publicadas hasta ahora radica en buena medida en su aplicación combinada con anticuerpos inhibidores de puntos de chequeo de la respuesta inmune los cuales restituyen la inmuno-vigilancia de los tumores [10, 12, 13, 66]. Estos anticuerpos sin embargo representan un sobre-costos para el futuro del uso de vacunas personalizadas en cáncer por lo tanto en la identificación de herramientas más al alcance de los pacientes que permitan restituir la inmuno-vigilancia de los tumores va a radicar la implementación en países como Colombia de estas herramientas que estén al alcance de los pacientes. Nuestros trabajos de los últimos años nos han permitido demostrar que la terapia neo-adyuvante como la que se utilizará en las pacientes del estudio son una forma accesible de lograr el restablecimiento de la vigilancia de los tumores por el sistema inmune. Nuestros resultados en materia de inmuno-monitoreo de pacientes con cáncer de mama en terapia neo-adyuvante demuestran que el uso de Doxorubicina y Ciclofosfamida rescatan la competencia de los compartimientos de linfocitos T y de células dendríticas en pacientes con cáncer tratadas [1] y (Bernal-Estevez D. y cols – BMC 2017 sometido). La recuperación de la respuesta inmune contra el tumor es de tal importancia que consideramos que la terapia neo-adyuvante brinda la mejor oportunidad para evaluar el papel que los fármacos utilizados en quimioterapia tienen sobre el desempeño del sistema inmune y esta relación con la respuesta clínica del paciente en terapia neo-adyuvante (Parra-López C. 2017 EMJ Reviews 2017 - sometido).

---

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inmunogenicidad y seguridad de vacunas basadas en péptidos sintéticos útiles para la inmuno-terapia en pacientes con cáncer de mama.

---

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

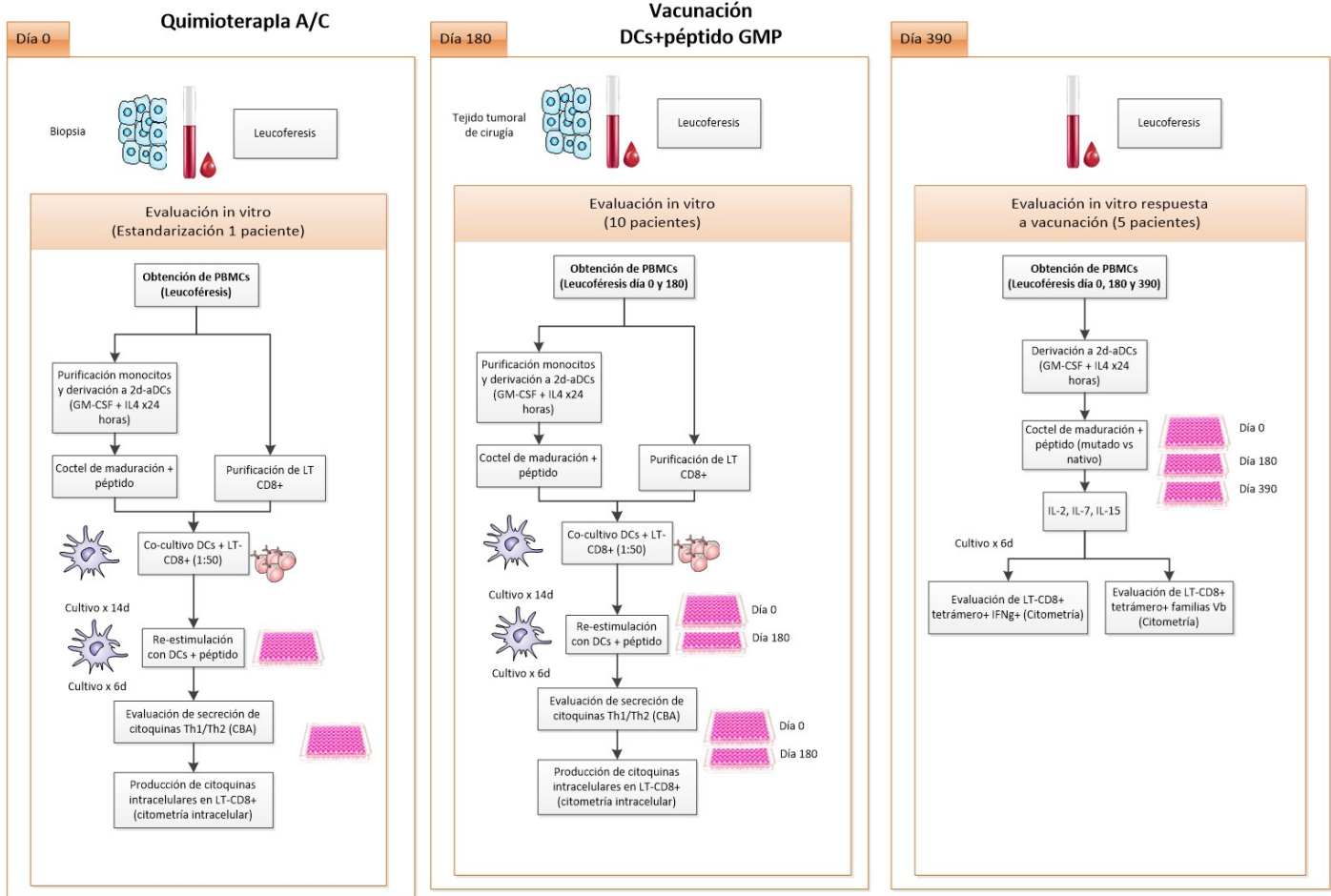
1. Establecer el universo de mutaciones únicas no sinónimas en tumores de pacientes con cáncer de mama triple negativo.
  2. Seleccionar mediante algoritmos predictivos mutaciones de un amino-ácido que generen epítopes inmuno-dominantes en cada paciente (Peptido-Mutoma-Inmunogénico (PMI)).
  3. Comprobar la inmunogenicidad in vitro de las epítopes dominantes.
  4. Demostrar la inmunogenicidad y seguridad in vivo de las epítopes más inmunogénicas en cada paciente al ser utilizada como vacuna sintética.
- 

## METODOLOGÍA

El presente estudio está dividido en dos fases, la primera la denominamos estudio PRE-CLÍNICO y la segunda estudio CLÍNICO. Para la fase inicial del estudio PRE-CLÍNICO invitaremos a participar a 40 pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama confirmado por patología que no expresa receptores para Progesterona, Estrógenos ni amplificación del oncogen Her2/neu (en adelante denominadas pacientes con CMTN). Las pacientes serán invitadas a una charla informativa donde se les ilustrará sobre el estudio y se les resolverá las dudas que tengan. Si las pacientes deciden participar del ensayo se procederá a la firma del consentimiento informado correspondiente a la fase pre-clínica (Ver consentimiento informado estudio PRECLÍNICO anexo). Como un paso inicial se debe establecer si la pacientes expresa el haplotipo (HLA-A\*02:01). La expresión de este haplotipo es importante en las pacientes del estudio por tres razones: (i) estudios previos hechos por nuestro grupo han revelado que entre el 25 y 30% de la población Colombiana expresa este alelo lo cual nos sugiere que encontraremos 10 pacientes HLA-A\*02:01 entre las 40 pacientes tamizadas con las cuales se realizarán las pruebas pre-clínicas in vitro; (ii) la expresión de este alelo facilita la selección por medios bio-informáticos de neo-epítopes del tumor las cuales se unen con alta afinidad a este alelo lo cual nos asegura que se podrán obtener complejos fluorescentes HLA-A\*0201/neo-epítopes tumorales (tetrámeros fluorescentes); y (iii) la disponibilidad de tetrámeros fluorescentes HLA-A\*0201/neo-epítope tumoral nos permitirá el inmuno-monitoreo y expansión en sangre periférica de linfocitos T CD8 específicos para las neo-epítopes HLA-A\*0201 restringidas no solo durante los análisis in vitro (fase PRECLÍNICA) - lo cual es un importante criterio para seleccionar las neo-epítopes que serán utilizadas como vacuna - sino en las pacientes luego de la vacunación (estudio CLÍNICO). Para identificar las pacientes que expresen al menos una copia del haplotipo (HLA-A\*02:01) se les tomará a la paciente una muestras de sangre periférica de 5 mL para realizar la tipificación. Un tamizaje inicial se hará por citometría de flujo para lo cual la muestra de sangre será teñida con el anticuerpo BB7.2-PE (BD) y con un anticuerpo control de isotipo IgG2b). Este análisis permite en una muestra de 300µL de sangre total seleccionar pacientes que expresen el grupo de alelos HLA-A\*02 luego de incubación con el anticuerpo por 15 min a temperatura ambiente seguida del lisado de eritrocitos con BD FACS “Lysing solution” durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, utilizando un equipo FacsAriall (BD) la muestra será analizada por citometría de flujo delimitando los leucocitos con los parámetros FSC (dispersión de luz frontal – forward scatter) y SSC (dispersión de luz lateral – side scatter), a partir de la cual se analiza en histograma el grado de tinción de las células en el canal de fluorescencia de PE. A las pacientes que resulten A2 positivas por este tamizaje por citometría se les realizará la tipificación molecular fina para HLA clase I (genes A, B y C) por medios moleculares de alta resolución. Si la paciente presenta este haplotipo y cumple con los otros criterios de inclusión es candidata a ingresar a la fase PRECLÍNICA del presente estudio. Del grupo de 40 pacientes invitaremos a participar en el estudio PRE-CLÍNICO a 10 que cumplan

todos los siguientes criterios de inclusión: 1. Ser una paciente a quien el oncólogo le prescribe tratamiento para su CMTN quimioterapia neo-adyuvante con Doxorubicina/ciclofosfamida (A/C) (cuatro ciclos) y Taxanos por un periodo de tiempo de seis meses en total seguido de cirugía para remoción del tumor. 2. Que sus leucocitos expresen al menos una copia de la proteína HLA-A\*02:01. 3. Tener entre 18 y 75 años. 4. No poseer enfermedad cardíaca. 5. Poseer un ecocardiograma con una FEVI mayor a 45% por ecocardiografía o ventriculografía. 6. Poseer un conteo de Neutrófilos mayor a 1500/mL mayor a 100000/mL. 7. Pacientes sin co-morbilidades médicas asociadas como diabetes o insuficiencia renal. 8. No poseer trastornos de coagulación. 9. Que no haya estado hospitalizada en el último mes. 10. Que no tenga otro tumor activo a excepción de tumores de piel de tipo carcinoma escamo-celular o baso-celular. 11. Que la quimioterapia inicie 15 días luego de haber aceptado participar en el estudio. 12. Poseer acceso venoso franco en vena de brazo contra-lateral al tumor que permita la realización de leuco-aféresis. A las 10 pacientes seleccionadas para la fase PRECLÍNICA se procederá: (i) a la toma de dos muestras de tumor la primera al día 0 por biopsia con aguja (dentro de los 15 días previos al inicio de la quimioterapia) y la segunda obtenida del tumor luego de quimioterapia y cirugía (día 180) con las cuales se establecerá el universo de mutaciones que posee el tumor antes y después de la quimioterapia y (ii) a la obtención de dos muestras enriquecidas en leucocitos ("Buffy") de su sangre en dos procedimientos de leuco-aféresis (el primero dentro de los 15 días previos al inicio de la quimioterapia y el segundo luego de 30 días de haber finalizado la quimioterapia (día 180)). Con el fin de estandarizar todos los ensayos in vitro de la fase PRECLÍNICA del estudio (identificación del universo de mutaciones y de neo-antígenos HLA-A\*0201 restringidos) durante los siguientes seis meses, en una de las 10 pacientes, haciendo uso de la biopsia de tumor tomada antes de la quimioterapia utilizando secuenciación de última generación a partir del "exoma" y el "transcriptoma" tanto del tumor como de la sangre se establecerá el universo de mutaciones del tumor y se identificarán neo-epítopes HLA-A\*0201 restringidas de alta afinidad mediante análisis bio-informáticos (ver metodología detallada necesaria para alcanzar Objetivos Específicos 1 y 2). Una vez finalizada el proceso bio-informático de selección de neo-antígenos HLA-A\*0201 restringidos se escogerá uno el cual será sintetizado químicamente como péptido de 25 amino-ácidos en su versión mutada y nativa. Con estos péptidos y con la muestra de leucocitos obtenidos en día 0 se procederá a la validación de su reconocimiento por linfocitos T CD8+ de la paciente presente en esta muestra (ver diagrama EVALUACIÓN INMUNOGENICIDAD DE NEOANTIGENOS IN VITRO).





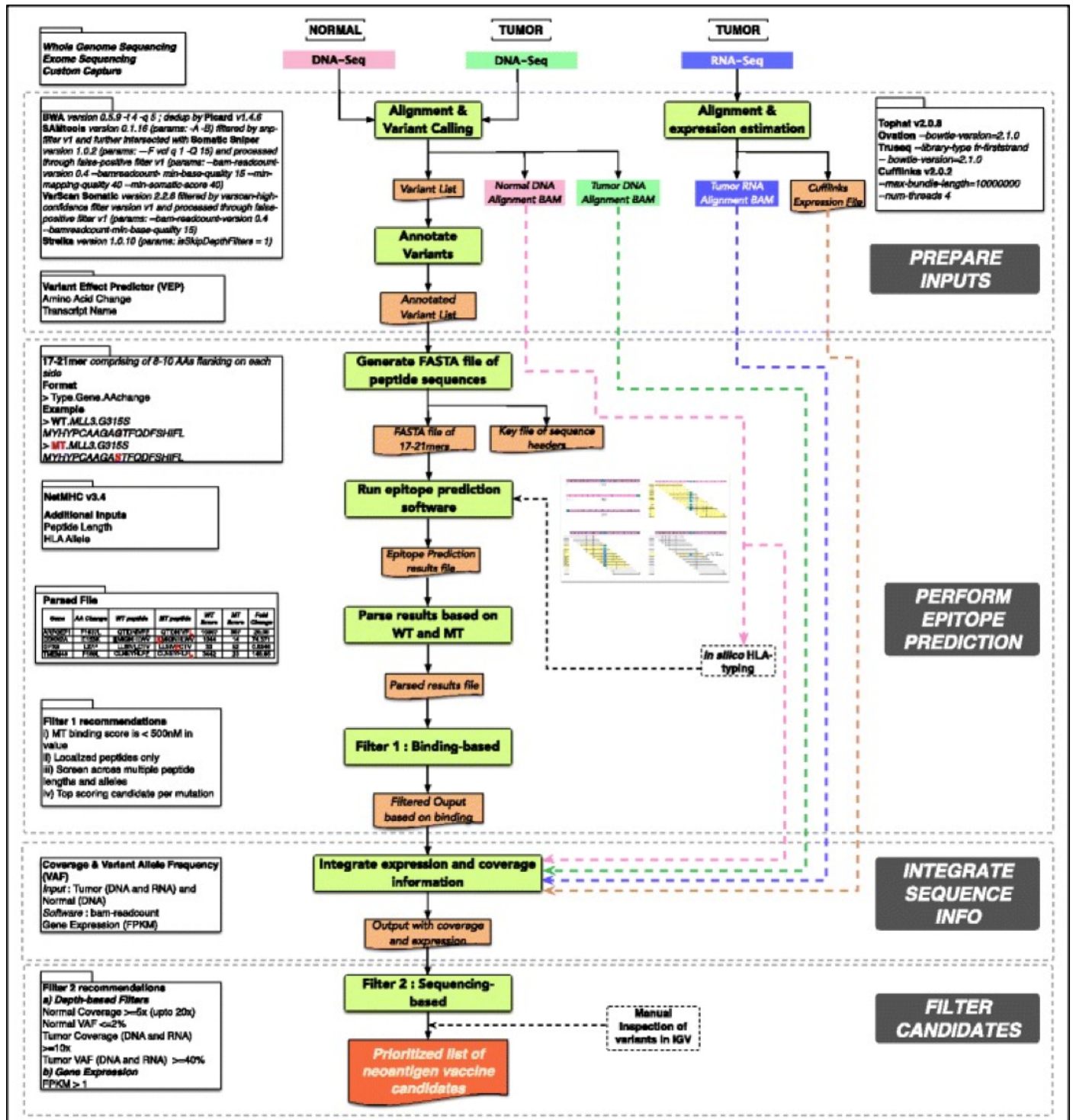
Una vez validada en una paciente la metodología para evidenciar el reconocimiento in vitro del neo-antígeno por linfocitos T CD8+ específicos para éste, se procederá a la identificación de neo-antígenos y evaluar su inmunogenicidad in vitro en cada una de las 10 pacientes empleando PBMCs obtenidas y crio-preservadas en área blanca de las dos muestras de sangre y cotejadas con los neo-antígenos identificados del tumor (tomadas pre- y pos-quimioterapia), con el fin de seleccionar cinco pacientes candidatas para la fase clínica. La selección de estas pacientes se basará en los siguientes requisitos: (i) El análisis de las mutaciones del tumor permite identificar al menos un péptido de 9 aminoácidos que contiene una de mutación el cual se une con alta afinidad a la molécula HLA-A\*02:01; (ii) Luego de los análisis in vitro se puede establecer que hay linfocitos T CD8+ en la sangre de la paciente que reconocen el neo-antígeno del tumor cuando es presentado en la molécula HLA-A\*0201. Este reconocimiento es establecido por la secreción por linfocitos T CD8+ de citoquinas Th1/Th2 en respuesta a la presentación por células dendríticas autólogas del neo-antígeno pero no del antígeno nativo in vitro.

**FASE PRE-CLÍNICA** Una vez seleccionadas las 10 pacientes comenzará la fase pre-clínica iniciando con el primer objetivo propuesto que es: Establecer el universo de mutaciones únicas no sinónimas en tumores de pacientes con cáncer de mama triple negativo. Para el cumplimiento de este objetivo se hará un análisis in silico, en primer lugar se hará el secuenciamiento genómico del exoma y transcriptoma de las muestras de las pacientes provenientes del tumor y de las células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés PBMCs) obtenidas en la primera leucoferesis. Con la obtención de las secuencias genómicas de cada paciente se podrá utilizar un sistema bioinformático GMS (por sus siglas en inglés Genoma Modeling System) desarrollado por el Instituto de genómica de Washington University. Este grupo es líder a nivel mundial en el estudio de la inmunoterapia como base para la generación de vacunas personalizadas contra el cáncer específicamente de melanoma. Griffith M y colaboradores en el 2015 crearon una plataforma bioinformática, este sistema permite construir una flujo de trabajo (workflow) para los requerimientos específicos de cada proyecto, de esta manera se puede especificar la herramienta o software, versión y nombre con el cual se desea trabajar según los requerimientos del estudio. Otra ventaja de esta herramienta es que tiene la capacidad de integrar los resultados



provenientes de secuencias de genoma completo, exoma y transcriptoma y analizarlos, esto permite tener un panorama tanto específico como general de la información [69]. La línea de trabajo diseñada para este estudio se basará en pasos que permitan detectar mutaciones somáticas no sinónimas para ello se utilizarán algoritmos, filtros y la eliminación de falsos positivos entre otras herramientas, lo que dará como resultado un análisis *in silico* preciso y confiable. El workflow para GMS empezará con el alineamiento de las secuencias del exoma del tumor y de los PBMC de cada paciente, el software que se utilizará será BWA (versión 0.5.9) [24, 70, 71]. Se hará un segundo alineamiento por medio de la herramienta Tophat 1.4 la cual permite el mapeo para lecturas de RNA-Seq usando el alineamiento con Bowtie y posteriormente se analiza el resultado de mapeo para identificar las uniones de empalme entre los exones. Bowtie permite alinear de manera rápida secuencias cortas de DNA. Para el realineamiento se utilizará Picard (versión 1.46). La detección de mutaciones somáticas se realizará con tres herramientas, la primera es SAMtools versión 0.1.16 seguida por VarScan Somatic versión 2.2.6 y la tercera: Strelka versión 1.0.10. Finalmente, se utilizará la herramienta Variant Effect Predictor (VEP), esto nos permitirá obtener una lista de variantes que incluye cambio de amino ácidos y secuencia del transcrito. Por medio de estrategias incluidas en GMS las mutaciones provenientes de la línea germinal quedan eliminadas y de esta manera solo se obtendrán las mutaciones somáticas. Una vez identificadas las mutaciones somáticas no sinónimas se desarrollará el segundo objetivo que es: Seleccionar mediante algoritmos predictivos el Peptido-Mutoma-Inmunogénico (PMI) para cada paciente. La metodología planteada se direcciona a un análisis bioinformático automatizado utilizando una herramienta creada por el grupo de Griffith y colaboradores (2016) de Washington University St. Louis- que permite tener un flujo de trabajo computacional simplificado para la identificación de neoantígenos personalizados para cáncer (personalized Variant Antigens by Cancer Sequencing (pVAC-Seq)) [59]. En un estudio publicado por el grupo de Washington University en el 2015 desarrollado por Carreño y colaboradores se demuestra que esta plataforma bioinformática pVAC-Seq junto con GMS son efectivas para la formulación de vacunas basadas en péptidos inmunogénicos aplicadas a cuatro pacientes con melanoma metastásico [10]. Para seleccionar las mutaciones con alta confidencialidad y las mutaciones que se expresan en la mayoría de células tumorales, se seleccionarán subsecuentemente variantes RNA-seq-based que estén presentes en al menos el 20% de la frecuencia alélica y sobre-lapado con las variantes del exome-based [13]. Esto se hará por medio del software FPKM siendo un buen método para filtrar solo los transcritos expresados junto con las herramientas Tophat y Cufflinks. A partir de estos resultados se construirá un archivo FASTA que consiste en dos secuencias de aminoácidos del sitio variante: Nativo (WT) proveniente de las células PBMC y mutado identificado en las células tumorales. Estas secuencias tendrán entre 8 a 10 amino ácidos (aa) que estarán flanqueando al amino ácido mutado, si la mutación está hacia el comienzo o final del transcrito se tomarán entre 16 a 20 amino ácidos previos o posteriores a la mutación respectivamente. Con los datos obtenidos de GMS en formato FASTA se procederá a la construcción del workflow para pVAC-Seq, se utilizará el software NetChop que permite la predicción del clivaje proteosomal. Por medio de la herramienta NetMHC3.4 o netMHCpan2.0. se realizará la predicción de los péptidos que tengan una alta afinidad de unión a MHC clase I (HLA-A\*02:01) teniendo como parámetro un valor de unión menor a <math>500\text{nM}</math> [11, 70]. Se seleccionarán 17 aa con el amino ácido mutado en la mitad, región donde se encontrarán los 9 amino ácidos con predicción de unión a MHC I de <math>500\text{nM}</math> validado por el programa NetMHC3.4 [24]. Se utilizará la herramienta SMM y SMMPMBEC para la predicción de la significancia estadística de datos de unión del péptido con la molécula HLA A\*02:01 (pMHC) [11]. Los filtros utilizados en este punto del proceso serán: Que los péptidos mutantes candidatos tengan un puntaje de unión menor a 500nM y que los epítopes de unión sean evaluados solo para los péptidos que contienen un amino ácido mutado. Estos filtros eliminan la secuencia de los péptidos nativos que están sobrelapados entre dos secuencias FASTA. Para seleccionar un único péptido candidato como vacuna, se debe tener en cuenta la profundidad de secuenciamiento y la fracción de lectura que contiene la variante alélica (VAF) esta información puede obtenerse con el uso de bam-readcount. La cobertura para el DNA y RNA de las células tumorales y de las células normales es calculada junto con el VAF a partir del

alineamiento del DNA y RNA-Seq. Debido a los altos costos de manufactura de los péptidos sintetizados con calidad GMP es de suma importancia el uso de una buena metodología que permita la selección de los mejores neoantígenos. Uno de los filtros usados es la predicción de alta unión del péptido al haplotipo de interés para este estudio. Para obtener mayor rigurosidad en la selección, pVAC-Seq permite el uso de los siguientes filtros: 1. Depth based filters donde se usan parámetros que eliminan variantes con una cobertura menor o igual a 5x y de las secuencias normales un VAF mayor al 2% y segundo, filtros basados en la expresión de las secuencias peptídicas candidatas. Es importante realizar una revisión manual para reducir los falsos positivos. La siguiente figura resume la metodología descrita anteriormente integrando los algoritmos a utilizar en cada paso.



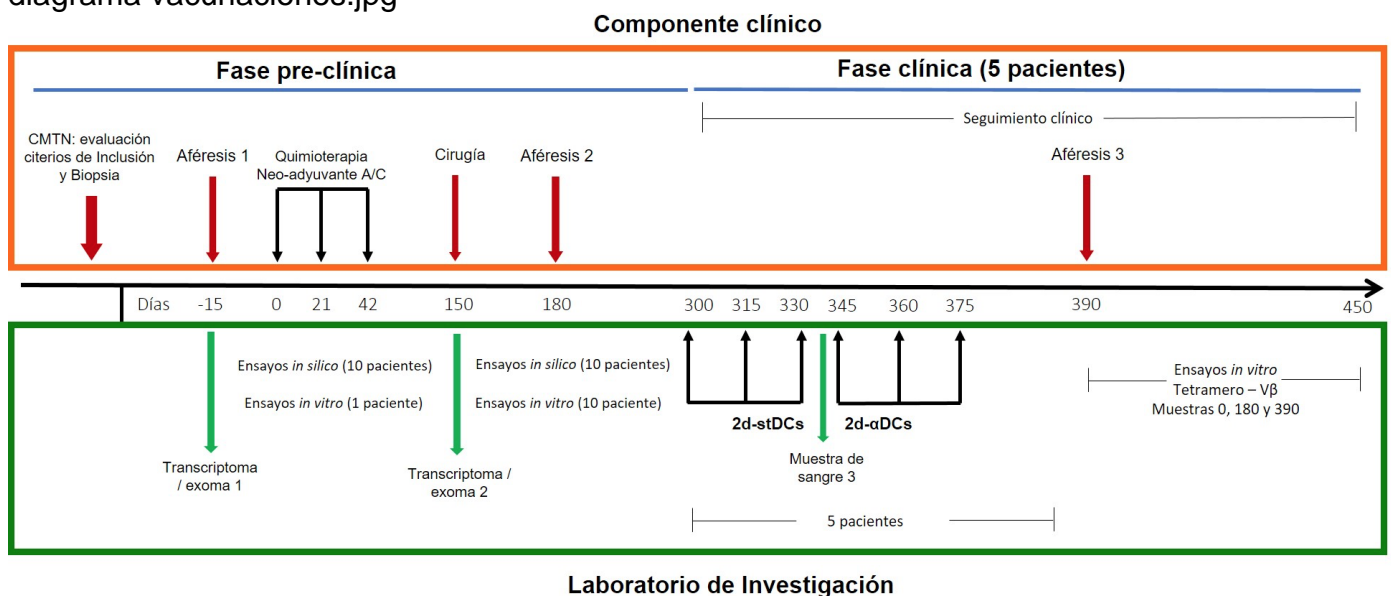
Metodología resumida para el flujo de trabajo en GMS y pVAC-Seq desarrollado por Griffith y colaboradores en el 2015 [69].

La hipótesis de trabajo es que la quimioterapia puede seleccionar células tumorales con

mutaciones puntuales encontradas en el día 0 y/o permitir la generación de nuevas mutaciones posterior a la quimioterapia. Debido a esto a partir del día 0 se comenzará con el secuenciamiento del exoma y transcriptoma lo que cronológicamente tendrá una duración entre 3 y 6 meses, tiempo en el que paralelamente las pacientes estarán en quimioterapia. Durante este tiempo se tomará las muestras de una paciente que haya mostrado los mejores resultados in silico con el fin de poner a punto la metodología in vitro que será explicada más adelante. Al día 180 momento en el cual la neoadyuvancia termina, se obtendrá una segunda leucoferesis y muestra del tumor de la cirugía programada dentro del tratamiento de la paciente. Esto permitirá el segundo análisis in silico que permitirá comparar la frecuencia de mutaciones inmunogénicas del día 0 y el día 180 con el fin de determinar si péptidos inmunogénicos con alta frecuencia identificados en el día 0 se mantienen con la misma o mayor frecuencia en las muestras del día 180 o por el contrario disminuyó la selección de dicha mutación. Si se obtiene el primer resultado se optará por seleccionar el péptido identificado del día 0 y si el péptido seleccionado del día 0 no se encuentra al día 180 se tomará la secuencia peptídica con mayor potencial inmunogénico, la cual será seleccionada con los datos provenientes de las muestras del día 180. Una vez se define de manera individualizada (10 pacientes) la secuencia peptídica candidata a vacuna, esta y su versión nativa se mandarían a sintetizar para realizar los ensayos in vitro previamente estandarizados. Lo que da lugar a la ejecución del tercer objetivo que es: Comprobar la inmunogenicidad in vitro de las epítopes dominantes. Para este set de ensayos se harán líneas celulares de Linfocitos T CD8 purificados los cuales serán estimulados con DCs maduras provenientes de las PBMCs del día 0 y 180. El primer ensayo que permitirá evaluar la inmunogenicidad será el Cytometric Bead Array (CBA - BD) el cual mide la secreción de citoquinas Th1 y Th2 humanas en los sobrenadantes de los cultivos, para ellos se tomarán LT-CD8+ (día 0 y 180) y DCs derivadas de monocitos (obtenidos a los días 0 y 180) las cuales serán pulsadas con el péptido seleccionado previo a su cocultivo con LT-CD8+ como se describe a continuación. En las células de este cultivo se evaluará la producción de interferón gamma intracelular en LT-CD8+ por citometría de flujo lo cual será comparada entre los cultivos de LT-CD8+ estimulados con DCs pulsadas con péptido mutado vs el nativo, con el fin de determinar la especificidad de la respuesta al neo-antígeno. Expansión de Linfocitos T CD8+ Para la expansión de LT-CD8+ se basará en la metodología descrita por Moser y cols, [72] donde en primer lugar se inducirán células dendríticas derivadas de monocitos en 96 pozos fondo redondo en 200uL de medio AIM-V al día -2, los cuales se cultivarán con IL-4 (750 UI/mL) y GM-CSF (1000UI/mL) por 24 horas. Posteriormente las células dendríticas inmaduras se pulsarán con el péptido mutado (5uM) en presencia del coctel de citoquinas pro-inflamatorias (IFN-g, IFN-a, TNF-a, IL-1B, IL-6, y Poly I:C) para inducir su maduración como lo describe Bernal-est y cols [2]. Una vez obtenidas las DCs maduras y pulsadas con los péptidos se purificarán LT-CD8+ a partir de  $2 \times 10^8$  de PBMCs crio-preservados mediante la tecnología MACS con el kit de aislamiento para CD8+ (Miltenyi Biotec, Germany), su pureza será verificada mediante citometría de flujo con el fin de obtener una pureza >95%. Los LT-CD8+ purificados se cultivarán a una razón 1:50 (DCs:LT-CD8+ -  $2 \times 10^3$  DCs:  $10^5$  LT-CD8+) en los 96 pozos que contienen las DCs maduras y pulsadas con el neo-antígeno. Este cultivo se mantiene por 14 días en medio de cultivo AIM-V libre de suero. Pasado los 14 días, el cultivo de células T será re-estimulado nuevamente con células dendríticas pulsadas con el péptido y cultivadas por 6 días más. Las citoquinas se medirán en los sobrenadante de los cocultivos usando el kit de CBA Th1/ Th2 para humanos siguiendo las instrucciones del fabricante. Evaluación de IFN- intracelular por citometría de flujo A partir de los cultivos positivos (producción de citoquinas TH1/Th2) por CBA en el ensayo anterior se cosecharan las células con el fin de determinar la producción de IFN-y intracelular en LT-CD8+. Para esto las células se fijarán y permeabilizarán con el Kit CytoFix/Perm (BD) y se marcarán con un anticuerpo contra IFN- fluoromarcado, la muestra será procesada por citometría de flujo en el equipo FACS Aria II (BD) y analizada en Flowjo (Treestar) para determinar el porcentaje de LT-CD8+ IFN-y +. Estos ensayos de inmunogenicidad se realizarán para las 10 pacientes empleando las muestras del día 0 y 180 como se muestra en el panel central del diagrama de la metodología de los ensayos in vitro. Debido a los altos costos para la generación de la vacuna se escogerán

solo 5 pacientes que hayan tenido los mejores resultados tanto in silico como in vitro y que cumplan con los criterios de selección para la síntesis de un péptido con calidad GMP. Estos criterios son: 1. Una alta producción de interferón gamma por el ensayo CBA y 2. Detección de interferón gamma intracelular en linfocitos LT-CD8 en respuesta específica al péptido mutado.

**FASE CLÍNICA** Para esta fase las 5 pacientes seleccionadas deberán firmar de manera voluntaria un consentimiento informado correspondiente a la fase clínica del estudio, lo que permitirá la continuación del trabajo para la realización del último objetivo el cual es: Demostrar la inmunogenicidad y seguridad in vivo de las epítopes más inmunogénicas en cada paciente al ser utilizada como vacuna sintética. La ejecución de este objetivo, se iniciará con la síntesis de un péptido con calidad GMP atendiendo a los lineamientos de la FDA de los Estados Unidos que se deben seguir para el control de calidad de péptidos sintéticos que van a ser utilizados en humanos como antígeno en una vacuna, seguido a esto, se generarán las células dendríticas para uso clínico en área blanca y se realizará el control de calidad de maduración y contaminación a estas células. Simultáneamente con el proceso de síntesis de cada péptido con calidad GMP, se obtendrán tetrámeros HLA-A\*02:01 fluorescentes para el respectivo péptido. Para la producción de las vacunas se seguirá la metodología de Carreño y colaboradores (2015) [10], la primera dosis de la vacuna tendrá lugar en los meses 10, 11 y 12 y para el mes 11 se tomará una muestra de sangre 50mL con el fin de hacer el inmunomonitorio de la respuesta al antígeno luego de las primeras tres dosis de la vacunación. Las pacientes serán vacunadas con seis dosis de células dendríticas (tres dosis con DCs estándar (st) seguidas de tres dosis de DC alfa) como se describe en la figura anexa (Anexo Diagrama vacunación pacientes).



Las muestras tomadas en los días 0, 180, 335 y 390 permitirán el inmuno-monitoreo de la respuesta de los linfocitos T CD8+ en respuesta a la vacuna. Así mismo permitirá el análisis de la eficacia de la vacunación para promover la expansión de estos linfocitos circulantes en sangre periférica. Al finalizar la vacunación en el mes 12 se hará la última leucoferesis (día 390) con el fin de hacer un seguimiento de la respuesta inmunológica de la vacuna por medio de ensayos de tetrámero y análisis de la familia de los V por citometría de flujo. La generación de la vacuna se hará en el área blanca de la Fundación Salud de Los Andes la cual cuenta con todas las normas de seguridad requeridas para dicho procedimiento y los investigadores a cargo de este procedimiento cuentan con la experiencia para su producción. Es importante resaltar que durante todo el estudio la paciente será monitoreada con el fin de asegurar su integridad y bienestar, esto se logrará por medio de controles médicos periódicos para evaluar el estado general de las pacientes y la evaluación de los efectos adversos derivados de la vacunación. Generación y formulación de células dendríticas para uso clínico La purificación de monocitos para esta fase del estudio se hará con los PBMCs crio-preservados provenientes de la segunda leucoferesis y se seguirá el protocolo estandarizado (procedimiento operativo estándar - POEs) por el grupo de

investigación de la Fundación Salud de los Andes, el cual actualmente está desarrollando un estudio clínico fase I, donde se ha demostrado la seguridad e inmunogenicidad de las vacunas con células dendríticas maduras autólogas en pacientes con cáncer de mama. Un total de  $1.4 \times 10^9$  PBMCs obtenidos serán descongelados y sembrados por dos horas en platos de 6 pozos ( $2 \times 10^7$ /pozo) con el fin de favorecer la adhesión de monocitos. Las células no adherentes que corresponden a linfocitos serán retirados por medio de lavados con PBS estéril, las células obtenidas de este procedimiento se dividirán en un grupo que se criopreservará para futuros ensayos in vitro y el otro grupo con el cual se continuara la siembra con el fin de obtener dendríticas maduras. Para la generación de las dendríticas, las células adherentes se cultivaran en medio AIM-V + IL4 y GM-CSF por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  para la inducción a DCs inmaduras. A partir de las DCs inmaduras se generarán dos tipos de DCs, la primera con el coctel estándar y la segunda con el coctel alpha. Para la generación de las DCs estándar (2d-stDCs) las DCs inmaduras serán estimuladas con el coctel de maduración de citoquinas pro-inflamatorias compuesto por: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y PGE2, para la generación de las DCs alpha (2d-aDCs), una vez los monocitos han sido diferenciados a iDCs como se mencionó anteriormente, se empleará un coctel de citoquinas compuesto por: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y Poly-I:C. Simultáneamente con la adición del coctel de maduración se pulsarán las DCs inmaduras a una concentración final de 5 $\mu\text{M}$  de péptido. Posterior a la incubación con los cocteles de citoquinas y péptido a  $37^\circ\text{C}$  + 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas, las células (tanto 2d-stDCs como 2d-aDCs) serán colectadas y crio-preservadas a una concentración de  $10^7$  DCs por vial para un total de 3 viales para cada tipo de DCs producidas [2]. A las DCs obtenidas se les verificará la maduración por medio de citometría de flujo metodología estandarizada por el grupo de investigación de la FSA. Este proceso incluye alícuotas de DC generadas las cuales se recolectaran y teñirán con los siguientes anticuerpos CD209 (DC-SIGN), HLA-DR, CD14, CD80, CD86, CD83 y CCR7 para analizar el adecuado fenotipo de las DCs maduras (tanto 2d-stDCs como 2d-aDCs). Las DCs serán sometidas a un control de calidad por medio de un servicio externo donde se hará prueba de endotoxinas, tinciones con gran, micoplasma y cultivos bacteriológicos entre otras que son importantes para asegurar la calidad y seguridad de la vacuna. Las citoquinas y reactivos empleados para la realización de la vacuna son para uso humano con calidad GMP (Cellgenix - Alemania) y cada procedimiento se hará bajo estrictas normas de buenas prácticas clínicas por profesionales entrenados para este fin. La toxicidad de DCs inyectadas en las pacientes, será evaluada de acuerdo a la escala del National Cancer Institute Common Toxicity Criteria CTCAE v4.0 ([http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_5x7.pdf](http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf), fecha de publicación: Mayo 28 de 2009, versión actualizada 4.03 junio 2010). Vacunación con DCs pulsadas con el neo-antígeno La vacunación seguirá el protocolo establecido y validado por el grupo de grupo de la FSA, las tres primeras dosis de la vacuna se harán con 2d-stDC que han sido pulsadas con el péptido y seguido a esto se harán tres vacunaciones con 2d-aDCs. Las células dendríticas maduras, pulsadas con péptido y congeladas se descongelarán en cada dosis (un crio vial por dosis) y se resuspenderán en 200 $\mu\text{L}$  de suero autólogo. Las vacunaciones se harán en los meses 10, 11 y 12 seis dosis cada 15 días (ver esquema de vacunación anexo). La vacuna será administrada de manera intradérmica cerca al drenaje linfático del seno contralateral (teniendo en cuenta que las pacientes serán vacunadas posterior a la mastectomía o cuadrantectomía del seno afectado). La paciente se mantendrá bajo observación médica mínimo durante 4 horas en una unidad de cuidados intermedios cada vez que le sea aplicada una dosis, para poder detectar posibles efectos secundarios presentados luego de la transferencia. En días subsiguientes a la transferencia de DCs las pacientes estarán monitorizadas por consulta externa por medicina general y en sus hogares mediante llamadas telefónicas. Este seguimiento se hace con el fin de monitorizar no solo el estado clínico general de la paciente sino además la aparición de efectos adversos inherentes al procedimiento los cuales han sido claramente definidos en este tipo de estudios y explicados previamente a la paciente. En caso de presentarse un efecto adverso, este será registrado por el médico y reportado al Comité de Ética que monitorizará el curso de la investigación. Evaluación in vitro de respuesta a la vacunación mediante tetrámero y análisis de familias de VB Con el fin de evaluar la respuesta específica de la vacunación de las



pacientes con las células dendríticas autólogas pulsadas con los neo-antígenos identificados, posterior a la última dosis (aproximadamente día 375) se le realizará una última leucoferesis (día 390) con el fin de tener una muestra de sangre post-vacunación. Los PBMCs obtenidos de las muestras de los días 0, 180 y 390, serán descongelados para cuantificar la expansión de LT-CD8+ específicos contra el neo-antígeno como se describe a continuación. Por cada paciente en un plato de 96 pozos fondo plano, se dispensarán un total de  $2 \times 10^6$  PBMCs en 12 pozos. En cada pozo los monocitos presentes en los PBMCs se diferenciarán a 2d-aDCs mediante el suplemento del medio de cultivo (AIM-V) con el coctel de citoquinas para la diferenciación de aDCs como se describió anteriormente simultáneamente con la adición del neo-antígeno. Como control se realizarán cultivo de PBMCs en 12 pozos paralelos que serán estimuladas con 2d-aDCs pulsadas con el péptido de la secuencia nativa correspondiente. Adicionalmente con el coctel de maduración de 2d-aDCs, para favorecer la expansión y detección de LT-CD8+ de memoria específicos contra el neo-antígeno, se suplementará el medio de cultivo con las citoquinas IL-7 (1ng/mL), IL-15 (1ng/mL) e IL-2 (100UI/mL). Posterior a seis días de cultivo, las células de cuatro de los 12 pozos se emplearán para el análisis por citometría de flujo de LT-CD8+ Tetrámero+ con una marcación intracelular de IFN-g. los ocho pozos restantes se emplearán para la determinación de las 24 familias de VB en LT-CD8+ tetrámero+ como lo describe Bernal-Estévez y cols [1]. Brevemente, se marcarán los cultivos con el tetrámero específico para el neo-antígeno por 4 horas, posteriormente las familias de VB se marcarán con el kit IOTest Beta Mark TCR VB (Beckman Coulter) con un coctel específico para tres familias de VB en cada tubo (A-H, 8 tubos en total, 24 familias) y con anti-CD8 conjugado al fluorocromo PE-Texas Red. El porcentaje de cada familia de V en las células T CD8+ específicas para cada tetrámero se evaluará por medio de citometría de flujo.

---

## RESULTADOS ESPERADOS DE LA INVESTIGACIÓN

Se espera que con el desarrollo de este proyecto se logre:

- Implementación de metodologías para establecer el universo de mutaciones de tumores de cáncer de mama triple negativo.
  - Implementación del uso de bio-informática para la predicción de epítopes altamente inmunogénicas que presentadas en el alelo MHC clase I HLA-A\*0201.
  - Implementar metodologías in vitro que permita validar y seleccionar epítopes inmunogénicas.
  - Demostrar la seguridad e inmunogenicidad de péptidos sintéticos utilizados como vacuna personalizada en pacientes con cáncer de mama.
  - Fortalecer la movilidad internacional de profesores y estudiantes desde la Universidad Nacional hacia las instituciones internacionales cooperantes (Louisiana State University) y de los profesores Jovanny Zabaleta y Pedro Romero hacia la Universidad Nacional.
  - Avanzar hacia la implementación de terapias celulares e inmuno-monitoreo en pacientes con cáncer.
  - Incursionar en la implementación de programas de medicina personalizada en cáncer en el Hospital Universitario Nacional.
  - Incrementar indicadores de productividad científica de los profesores participantes en el Proyecto
- 

## POSIBLES EVALUADORES

Nombre	Filiación	Correo electrónico	Dirección contacto	Teléfono
Susana Fiorentino	Pontificia Universidad Javeriana - Bogotá D.C.- Colombia	susana.fiorentino@javeriana.edu.co	Carrera 7 No. 40 - 62	(57 1) 3208320
Mauricio Rojas	Universidad de Antioquia	mauricio.rojas@udea.edu.co	Calle 67 Número 53 – 108 Medellín	(57 4) 219 64 63
Paulo Rodríguez	Associate Professor Cancer Immunology, Inflammation and Tolerance Program Georgia Cancer Center	PauRodriguez@augusta.edu	1410 Laney Walker Blvd, Room CN 4114 Augusta, GA, 30912	+1 706-446-5808

## IMPACTO AMBIENTAL DEL PROYECTO

Este ensayo clínico tiene de fundamento la aplicación a pacientes con cáncer de mama triple negativas una combinación de células dendríticas autólogas con péptidos sintéticos (calidad GMP) que sean específicos para las mutaciones puntuales no sinónimas presentes en las células del tumor de cada paciente. Esto ha sido probado en diferentes instituciones de alto reconocimiento mundial donde han observado que este tipo de terapias son seguras y tienen una gran capacidad de reducir la carga tumoral de los pacientes vacunados. No obstante, por ser un estudio de investigación pueden presentarse efectos adversos, que por la experiencia de nuestro grupo como de otros, son efectos limitados leves que no implicarían un efecto negativo sobre la salud de las pacientes. En relación con el medio ambiente todos los procesos de laboratorio para el manejo de sustancias biológicas y químicas son manejados bajo los controles de buenas prácticas de laboratorio (BPL) y Buenas prácticas clínicas (BPC). Lo cual el manejo de residuos químicos, biológicos y anatomopatológicos tendrá el menor impacto posible al medio ambiente. El manejo de residuos de laboratorio se basa en las normas implementadas por el laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y el área blanca de la Fundación Salud de los Andes.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1. Bernal-Estevez, D., et al., \*Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient\*. BMC Cancer, 2016. \*\*16\*\*: p. 591.](#)
- [2. Bernal-Estévez, D., D. Tovar, and C. Parra-López, \*Functional and phenotypic analysis of two-day monocyte-derived dendritic cells suitable for immunotherapy purposes\*. SOJ Immunology, 2016. \*\*4\*\*\(2\).](#)
- [3. Bernal-Estévez, D.A., et al., \*AN IMMUNE SURVEILLANCE MODEL TO MONITOR THE RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY TREATMENT IN BREAST CANCER PATIENTS\*. Frontiers in Immunology.](#)
- [4. Bernal-Estévez, D.A., et al., \*USEFULNESS OF TWO DAY TYPE I ALPHA DENDRITIC CELLS TO MONITOR T CELL IMMUNITY ELICITED BY ANTI TUMOR THERAPY\*. Frontiers in Immunology.](#)



5. [Mittal, D., et al., \*New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape.\* Curr Opin Immunol, 2014. \*\*27\*\*: p. 16-25.](#)
6. [Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, \*Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.\* Science, 2011. \*\*331\*\*\(6024\): p. 1565-70.](#)
7. [Kirilovsky, A., et al., \*Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients.\* Int Immunol, 2016. \*\*28\*\*\(8\): p. 373-82.](#)
8. [Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, \*Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion.\* Nat Rev Immunol, 2006. \*\*6\*\*\(10\): p. 715-27.](#)
9. [Li, J., L. Ni, and C. Dong, \*Immune checkpoint receptors in cancer: redundant by design?\* Curr Opin Immunol, 2017. \*\*45\*\*: p. 37-42.](#)
10. [Carreno, B.M., et al., \*Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells.\* Science, 2015. \*\*348\*\* \(6236\): p. 803-8.](#)
11. [Gubin, M.M., et al., \*Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy.\* J Clin Invest, 2015. \*\*125\*\*\(9\): p. 3413-21.](#)
12. [Linnemann, C., et al., \*High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma.\* Nat Med, 2015. \*\*21\*\*\(1\): p. 81-5.](#)
13. [Yadav, M., et al., \*Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing.\* Nature, 2014. \*\*515\*\*\(7528\): p. 572-6.](#)
14. [Anderson, B.O., et al., \*Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit 2007.\* Cancer, 2008. \*\*113\*\*\(8 Suppl\): p. 2221-43.](#)
15. [Villarreal-Garza, C., et al., \*Breast cancer in young women in Latin America: an unmet, growing burden.\* Oncologist, 2013. \*\*18\*\* Suppl: p. 26-34.](#)
16. [Thompson, D. and D. Easton, \*The genetic epidemiology of breast cancer genes.\* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004. \*\*9\*\*\(3\): p. 221-36.](#)
17. [Bianchini, G., et al., \*Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease.\* Nat Rev Clin Oncol, 2016. \*\*13\*\*\(11\): p. 674-690.](#)
18. [Collignon, J., et al., \*Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions.\* Breast Cancer \(Dove Med Press\), 2016. \*\*8\*\*: p. 93-107.](#)
19. [Ibrahim, E.M., et al., \*The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis.\* Breast Cancer Res Treat, 2014. \*\*148\*\*\(3\): p. 467-76.](#)
20. [Adams, S., et al., \*Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199.\* Journal of Clinical Oncology, 2014. \*\*32\*\*\(27\): p. 2959-2966.](#)
21. [Loi, S., et al., \*Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98.\* J Clin Oncol, 2013. \*\*31\*\*\(7\): p. 860-7.](#)
22. [Smid, M., et al., \*Patterns and incidence of chromosomal instability and their prognostic relevance in breast cancer subtypes.\* Breast Cancer Res Treat, 2011. \*\*128\*\*\(1\): p. 23-30.](#)
23. [Carreno B. M., e.a., \*A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells.\* Science, 2015. \*\*348\*\*\(6236\): p. 388-391.](#)
24. [Rizvi, N.A., et al., \*Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer.\* Science, 2015. \*\*348\*\*\(6230\): p. 124-8.](#)
25. [Kavanagh, B., et al., \*Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I\*](#)

- peptides*. *J Immunother*, 2007. **30**(7): p. 762-72.
26. Mehrotra, S., et al., *Vaccination with poly(IC:LC) and peptide-pulsed autologous dendritic cells in patients with pancreatic cancer*. *J Hematol Oncol*, 2017. **10**(1): p. 82.
27. Melief, C.J., *Cancer immunotherapy by dendritic cells*. *Immunity*, 2008. **29**(3): p. 372-83.
28. Osada, T., et al., *Dendritic cell-based immunotherapy*. *Int Rev Immunol*, 2006. **25**(5-6): p. 377-413.
29. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 265-77.
30. Guarneri, V., et al., *Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(7): p. 1037-44.
31. Miyashita, M., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study*. *Breast Cancer Res*, 2015. **17**: p. 124.
32. DeNardo, D.G., et al., *Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy*. *Cancer Discovery*, 2011.
33. Ruffell, B., et al., *Leukocyte composition of human breast cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(8): p. 2796-2801.
34. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. *J Exp Med*, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
35. Galluzzi, L., et al., *Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy*. *Oncoimmunology*, 2012. **1**(7): p. 1111-1134.
36. Vacchelli, E., et al., *Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(10): p. e25771.
37. Draube, A., et al., *Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e18801.
38. Avigan, D., *Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy*. *Blood Rev*, 1999. **13**(1): p. 51-64.
39. Banchereau, J., et al., *Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine*. *Cancer Res*, 2001. **61**(17): p. 6451-8.
40. Hsu, F.J., et al., *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells*. *Nat Med*, 1996. **2**(1): p. 52-8.
41. Motta, M.R., et al., *Generation of dendritic cells from CD14+ monocytes positively selected by immunomagnetic adsorption for multiple myeloma patients enrolled in a clinical trial of anti-idiotype vaccination*. *Br J Haematol*, 2003. **121**(2): p. 240-50.
42. Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R.M. Steinman, *The use of dendritic cells in cancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(2): p. 138-47.
43. Lenahan, C. and D. Avigan, *Dendritic cell defects in patients with cancer: mechanisms and significance*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(1): p. 101.
44. Pinzon-Charry, A., et al., *Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer*. *Br J Cancer*, 2007. **97**(9): p. 1251-9.
45. Curiel, T.J., et al., *Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(16): p. 5535-8.
46. Fricke, I. and D.I. Gabrilovich, *Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison*. *Immunol Invest*, 2006. **35**(3-4): p. 459-83.
47. Bloy, N., et al., *Trial watch: Dendritic cell-based anticancer therapy*. *Oncoimmunology*, 2014. **3**(11): p. e963424.
48. Berntsen, A., et al., *Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial*. *J Immunother*, 2008. **31**(8): p.

771-80.

49. [Wierecky, J., et al., \*Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients\*. \*Cancer Res\*, 2006. \*\*66\*\* \(11\): p. 5910-8.](#)
50. [Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, \*Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha\*. \*J Exp Med\*, 1994. \*\*179\*\*\(4\): p. 1109-18.](#)
51. [Dauer, M., et al., \*Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors\*. \*J Immunol\*, 2003. \*\*170\*\*\(8\): p. 4069-76.](#)
52. [Dauer, M., et al., \*FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells\*. \*J Immunol Methods\*, 2005. \*\*302\*\*\(1-2\): p. 145-55.](#)
53. [Mailliard, R.B., \*-Type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity\*. \*Cancer Research\*, 2004. \*\*64\*\*\(17\): p. 5934-5937.](#)
54. [Finn, O.J., \*Cancer vaccines: between the idea and the reality\*. \*Nat Rev Immunol\*, 2003. \*\*3\*\*\(8\): p. 630-41.](#)
55. [Klebanoff, C.A., L. Gattinoni, and N.P. Restifo, \*CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy\*. \*Immunol Rev\*, 2006. \*\*211\*\*: p. 214-24.](#)
56. [Robbins, P.F., et al., \*A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes\*. \*J Exp Med\*, 1996. \*\*183\*\*\(3\): p. 1185-92.](#)
57. [Monach, P.A., et al., \*A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution\*. \*Immunity\*, 1995. \*\*2\*\*\(1\): p. 45-59.](#)
58. [Dubey, P., et al., \*The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68\*. \*J Exp Med\*, 1997. \*\*185\*\*\(4\): p. 695-705.](#)
59. [Hundal, J., et al., \*pVAC-Seq: A genome-guided in silico approach to identifying tumor neoantigens\*. \*Genome Med\*, 2016. \*\*8\*\*\(1\): p. 11.](#)
60. [Simpson, A.J., et al., \*Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer\*. \*Nat Rev Cancer\*, 2005. \*\*5\*\*\(8\): p. 615-25.](#)
61. [Blum, J.S., P.A. Wearsch, and P. Cresswell, \*Pathways of antigen processing\*. \*Annu Rev Immunol\*, 2013. \*\*31\*\*: p. 443-73.](#)
62. [Honeyman, M.C., et al., \*Neural network-based prediction of candidate T-cell epitopes\*. \*Nat Biotechnol\*, 1998. \*\*16\*\*\(10\): p. 966-9.](#)
63. [Lundegaard, C., M. Nielsen, and O. Lund, \*The validity of predicted T-cell epitopes\*. \*Trends Biotechnol\*, 2006. \*\*24\*\*\(12\): p. 537-8.](#)
64. [Nielsen, M., et al., \*The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage\*. \*Immunogenetics\*, 2005. \*\*57\*\*\(1-2\): p. 33-41.](#)
65. [Boon, T., et al., \*Tumor antigens recognized by T lymphocytes\*. \*Annu Rev Immunol\*, 1994. \*\*12\*\*: p. 337-65.](#)
66. [Gubin, M.M., et al., \*Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens\*. \*Nature\*, 2014. \*\*515\*\*\(7528\): p. 577-81.](#)
67. [Capietto, A.H., S. Jhunjunwala, and L. Delamarre, \*Characterizing neoantigens for personalized cancer immunotherapy\*. \*Curr Opin Immunol\*, 2017. \*\*46\*\*: p. 58-65.](#)
68. [Kenter, G.G., et al., \*Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia\*. \*N Engl J Med\*, 2009. \*\*361\*\*\(19\): p. 1838-47.](#)
69. [Griffith, M., et al., \*Genome Modeling System: A Knowledge Management Platform for Genomics\*. \*PLoS Comput Biol\*, 2015. \*\*11\*\*\(7\): p. e1004274.](#)
70. [Stronen, E., et al., \*Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires\*. \*Science\*, 2016. \*\*352\*\*\(6291\): p. 1337-41.](#)
71. [Li, H. and R. Durbin, \*Fast and accurate long-read alignment with Burrows-\*](#)

[Wheeler transform. \*Bioinformatics\*, 2010. \*\*26\*\*\(5\): p. 589-95.](#)

[72. Moser, J.M., et al., \*Optimization of a dendritic cell-based assay for the in vitro priming of naive human CD4+ T cells\*. \*J Immunol Methods\*, 2010. \*\*353\*\*\(1-2\): p. 8-19.](#)

[73. Pol, J., et al., \*Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines\*. \*Oncoimmunology\*, 2015. \*\*4\*\*\(4\): p. e974411.](#)

[74. Liu, K.J., et al., \*A phase I clinical study of immunotherapy for advanced colorectal cancers using carcinoembryonic antigen-pulsed dendritic cells mixed with tetanus toxoid and subsequent IL-2 treatment\*. \*J Biomed Sci\*, 2016. \*\*23\*\*\(1\): p. 64.](#)

[75. Weinstock, M., J. Rosenblatt, and D. Avigan, \*Dendritic Cell Therapies for Hematologic Malignancies\*. \*Mol Ther Methods Clin Dev\*, 2017. \*\*5\*\*: p. 66-75.](#)

---

## POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES

Implementar en nuestro medio la operatividad de un gran número de nuevas metodologías fundamentales para alcanzar los objetivos es uno de los importantes desafíos en este proyecto.

Sin embargo confiamos que el poder contar dentro de la Universidad con profesores como el Profesor Luis Fernando Niño quienes cuentan con experiencia, infra-estructura de laboratorio, equipos y miembros de sus grupo de investigación con formación en bio-informática quienes han venido desarrollando proyectos de investigación en el área de manejo de bases de datos y de algoritmos predictivos consideramos una importante fortaleza de este proyecto. El tener expertos dentro de la Universidad como el Profesor Niño nos va a posibilidad captar rápidamente las directrices de expertos como el Profesor Robert Schireber en el centro de Genética de la Universidad de Washington y el Profesor Jovanny Zabaleta en Louisiana State University quienes son expertos en el tipo de trabajo que debemos realizar. El componente de ensayos inmunológicos consideramos va a reviste algunas dificultades en el tamizaje de un alto número de péptido como antígenos para los linfocitos T. Confiamos que con la asesoría del Profesor Pedro Julio Romero quien por espacio de 22 años ha estado vinculado al Ludwig Institute for Cancer Research en Lausana Suiza, vinculado a la Universidad de Lausana y quien es un verdadero experto en ensayos in vitro para la caracterización del inmuno-fenotipo de linfocitos T anti-tumorales como los que debemos identificar en nuestro estudio, podemos salir airoso en esta parte. Tanto el Profesor Zabaleta como el Profesor Romero han manifestado su disposición para recibir a estudiantes en formación de maestría o doctorado que se vincularán al proyecto con el fin de facilitarnos la transferencia de tecnología a nuestros laboratorios en Colombia. Los altos costos de producción de los péptidos con calidad GMP para uso humano es una importante preocupación para el desarrollo del estudio CLÍNICO debido a que por lo limitado del presupuesto no pudimos destinar un presupuesto mayor para la compra de estos péptidos.

Desde ya hemos entrado en contacto con grupos como los del Profesor Melief en Holanda líder en el uso de péptidos sintéticos largos (de entre 19 y 25 amino-ácidos como los que será necesario producir en nuestro trabajo) en la inmuno-terapia con este tipo de péptidos en pacientes con carcinoma de mama con el fin de explorar la posibilidad de lograr la síntesis de cinco péptidos con calidad GMP necesarios para este estudio con el presupuesto que tenemos destinado en este momento para tal fin. Finalmente teniendo en cuenta que para desarrollar el estudio CLÍNICO a la luz de resolución No 2378 de 2008 que en parte aplica para el desarrollo de este estudio lo cual demanda que el protocolo de investigación sea avalado y aprobada su realización por el INVIMA, nos preocupa el tiempo que nos pueda demandar la iniciación del estudio CLÍNICO debido al tiempo que le pueda tomar a esta dependencia pronunciarse sobre el particular. Nuestro temor de que esto pueda demandar por lo menos un año es debido a que no existen antecedentes en nuestro país ni en países de la región de este tipo de estudio. En previsión de que el análisis y aprobación por el INVIMA pueda tomar un tiempo considerable, una vez aprobado el proyecto por COLCIENCIAS y simultáneamente con el desarrollo del estudio



PRECLINICO el cual puede ser iniciado debido a que cuenta con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, daremos inicio al proceso de radicación del protocolo del ensayo clínico ante el INVIMA con el fin de que este sea revisado por esta institución. Confiamos que una vez terminado los estudios in-silico e in-vitro del estudio PRECLÍNICO (mes 9-10), obtengamos la aprobación por parte del INVIMA para poder proceder con la fase clínica del estudio. Por las características clínicas de las pacientes sumados a lo restrictivo de los criterios de inclusión del estudio, es posible que la fase de reclutamiento de las pacientes sea demorado. Para manejar lo anterior hemos previsto un periodo de 6 meses y hemos convocado a participar a las siguientes instituciones prestadoras de salud con servicios de oncología con el fin de tener un mejor acceso a pacientes para el estudio: Clínica del Seno, Hospital Universitario Nacional, Instituto Nacional de Cancerología, Oncocare y el Hospital el Tunal.

---

## ENSAYO CLÍNICO (SI APLICA)

El presente ensayo clínico fase 1, busca vincular pacientes con cáncer de mama triple-negativo para identificar mutaciones exclusivas en células tumorales para definir péptidos inmunogénicos los cuales serán empleados para pulsar células dendríticas (DCs) autólogas quienes ejecutarán su función de activación del sistema inmune presentando la neo-epítipe a linfocitos T CD8. Las pacientes serán vacunadas con DCs resuspendidas en 200uL de suero autólogo vía intradérmica en seis dosis. Durante y posterior a la vacunación las pacientes serán vigiladas con el fin de monitorear cualquier evento adverso que pudiese ocurrir debido a la vacunación. Este estudio clínico será registrado en la página [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), bajo la entidad de la Universidad Nacional de Colombia.

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto representa una continuación de los estudios clínicos que hace parte del macro-proyecto de Terapias Biológicas en Cáncer (TEBICA) que ha venido siendo adelantado por el Grupo de Inmunología y Medicina Traslacional (I&MT) dirigido por el Profesor Carlos Parra (investigador principal del presente proyecto) el cual incursionó en la fase de estudios clínicos desde hace tres años con un primer ensayo clínico titulado: INMUNOGENICIDAD Y SEGURIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTÓLOGAS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON QUIMIOTERAPIA NEO-ADYUVANTE, estudio Fase I/II desarrollado en el marco de una alianza entre la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación Salud de los Andes (FSA). Los alcances logrados por el estudio son de gran importancia para el desarrollo tecnológico del país en este campo. El estudio tiene como objetivo evaluar la inmunogenicidad y seguridad de DCs autólogas como potenciadoras de la respuesta inmune en pacientes con cáncer de mama ductal en quimioterapia neo-adyuvante. Los resultados de este trabajo han mostrado que las células dendríticas -producidas por nosotros en el área blanca de la FSA - cumplen con estándares de calidad y de seguridad de DCs producidas con fines de inmuno-terapia en pacientes con cáncer ya que su administración a pacientes con cáncer de mama en quimioterapia-neo-adyuvante hasta el momento no ha producido efectos adversos en las pacientes vacunadas.

Debido a los buenos resultados obtenidos del uso de DCs en el estudio clínico en curso con el fin de dar continuidad a los trabajos de INMUNOTERAPIA del cáncer del grupo I&MT y de la FSA proponemos el desarrollo del presente estudio clínico Fase I en el que se evaluará la inmunogenicidad y seguridad de DCs pulsadas con péptidos tumorales producidos con calidad GMP como vacuna en un grupo de cinco pacientes con cáncer de mama triple negativo. Los péptidos incorporan en su secuencia una mutación no sinónima propia del tumor lo cual se espera sean reconocidos como neo-antígenos extraños por las células del sistema inmune de la

paciente. Debido a que el péptido que será utilizado como vacuna posee una mutación exclusiva del tumor no codificada en la línea germinal de las células sanas, con esta estrategia generaremos una vacuna que generará en las pacientes vacunadas una respuesta inmune altamente específica contra el tumor la cual se espera reconozca de manera exclusiva el tumor como algo extraño sin ningún impacto sobre las células sanas.

Como lo exigen las normas internacionales, los péptidos usados para pulsar las DCs autólogas en cada paciente de nuestro estudio deberán ser producidos en condiciones GMP (por sus siglas en inglés Good Manufacturing Practice) para lo cual se contratará su manufactura con una entidad fuera del país certificada para esto por la agencia que controla la autorización, manufactura y venta de alimentos, medicamentos y productos farmacéuticos en diferentes países incluyendo Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés Food and Drug Administration), los péptidos deberán ser purificados por HPLC, libres de agentes biológicos (micro-organismos) y con concentración de endotoxina bacteriana, metales pesados y material residual de la síntesis química de los mismos inferior al límite permitido. Lo anterior asegura que el producto a ser utilizado sea de alta calidad y no posea ningún riesgo para su uso como vacuna. Las vacunas basadas en péptidos para la inmunoterapia del cáncer han venido siendo utilizadas en pacientes desde hace más de 30 años en decenas de pacientes en numerosos estudios clínicos en EE.UU y Europa en pacientes con diferentes tipos de tumor, en el año 2016 un total de 60 ensayos clínicos con péptidos como vacuna estaban registrados en el Instituto Nacional de Cancer de los Estados Unidos [74].

El primer ensayo clínico con células dendríticas pulsadas con péptidos como vacuna fue realizado hace 22 años en inmunoterapia de pacientes con melanoma y hoy las DCs representan una verdadera opción para la inmunoterapia con péptidos personalizados de pacientes con melanoma [10] y con otros antígenos en pacientes con tumores que no responde a terapias tradicionales como el CMTN [17, 18]. Por años, varios grupos de investigación a nivel mundial han adelantado estudios clínicos con DCs como vacuna en diferentes tipos de cáncer como melanoma [10], colorrectal [75], páncreas [26], leucemias [76], luego de lo cual se puede concluir que su uso como vacuna en la inmunoterapia del cáncer en numerosos estudios clínicos han evidenciado que las DCs son inmunogénicas y seguras ya que no generen efectos adversos serios [47]. En este proyecto se desarrollan distintas actividades que demandan el uso de una serie de metodología unas "in silico" otras de pruebas pre-clínicas en el laboratorio y finalmente la intervención de cinco pacientes con una vacunación personalizado con DCs pulsadas con péptidos exclusivos de su tumor en un estudio CLÍNICO Fase I. El componente de estudio PRECLINICO con 10 pacientes (días 0 hasta el día 300) será seguido con la participación de cinco de ellas en el estudio CLÍNICO en el cual las pacientes serán vacunadas con seis dosis de DCs pulsadas con péptidos entre los días 300 y 360 del inicio del estudio PRECLÍNICO. Al estudio PRECLINICO se invitarán a participar a 40 voluntarias y de ellas 10 pacientes serán incluidas en el estudio PRECLINICO las cuales deben reunir los criterios de inclusión. Luego de 10 meses de duración del estudio PRECLÍNICO se invitarán a participar en el estudio CLÍNICO a las cinco pacientes de quienes hayamos podido generar la mejor posibilidad de vacuna personalizada (ver consentimientos informados estudios PRECLINICO y CLÍNICO). La participación de las 10 pacientes en el estudio PRECLÍNICO inicia con la toma de una biopsia del tumor (muestra de tumor pre-quimioterapia) y toma de leucocitos mediante procedimiento de la leuco-aféresis. Estos dos procedimientos deberán ser realizados por lo menos 15 días previos al inicio de la quimioterapia. Finalizada la quimioterapia (aproximadamente día 180 luego de iniciado el estudio PRECLÍNICO), el tumor será removido en cirugía y de este la paciente deberá autorizar la toma de una nueva biopsia de la pieza quirúrgica (tumor pos-quimioterapia). Luego de la cirugía se realizará la toma de una segunda leuco-aféresis.

Simultáneamente, a partir del día 0 se comenzarán a hacer los análisis bio-informáticos, los cuales consisten en el uso de softwares, bases de datos ya establecidas y algoritmos, para obtener secuencias peptídicas individualizadas cuya inmunogenicidad será evaluada manera in-vitro con el fin de escoger aquellos péptidos, uno por paciente, que sean óptimos para el diseño de una vacuna para la paciente. Al día 300 inicia el ensayo clínico donde se procede a vacunar a

cinco pacientes que acepten continuar al estudio CLÍNICO y cumplan con los criterios de inclusión (ver criterios de inclusión en consentimiento informado estudio CLÍNICO). Serán cinco las pacientes participantes del estudio PRECLÍNICO quienes podrán participar en el estudio CLÍNICO para lo cual deberán formalizar su participación mediante la firma de un nuevo consentimiento informado. La participación de las pacientes en el estudio CLÍNICO comprenderá la vacunación con seis dosis de DCs autólogas pulsadas con el péptido exclusivo del tumor de cada paciente. Luego de tres dosis de vacuna (administradas cada 15 días), se tomará una nueva muestra de sangre al día 330 y una tercera leuco-aféresis el día 390, 15 días luego de la sexta y última dosis de vacuna.

El estudio CLÍNICO evalúa la inmunogenicidad y seguridad de DCs producidas con productos ancilares en el laboratorio las cuales serán pulsadas in vitro con un péptido sintético como vacuna personalizada. De esta forma el péptido no representa una herramienta NO FARMACOLÓGICA. El estudio CLÍNICO se adelantará siguiendo las normas estipuladas en el artículo 13 RESOLUCION Nº 008430 DE 1993 (4 DE OCTUBRE DE 1993), TÍTULO III, CAPÍTULO III, ARTÍCULOS 60 y 61, que establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación de otros nuevos recursos terapéuticos (DIFERENTES A LOS FARMACOLÓGICOS), ya que el presente estudio pretende evaluar la inmunogenicidad y seguridad de una vacuna sintética personalizada cuyo antígeno que la compone no será administrada directamente al paciente sino será administrado en DCs que han sido pulsadas in vitro con el péptido en busca que las DCs pulsadas puedan ofrecer un beneficio directo a pacientes con cáncer de mama triple negativo. Por lo anterior, según la misma Resolución, TÍTULO II, CAPÍTULO I, ARTÍCULO 11, este estudio se clasifica en la categoría C “Investigaciones con riesgo mayor que el mínimo”.

De igual manera, el Investigador Principal responsable del estudio deberá asegurar que este estudio se lleve a cabo en completa conformidad con la revisión actual de la Declaración de Helsinki (Helsinki, Finlandia, 1964) y las regulaciones de la US FDA Regulations, con el propósito de brindar la mayor protección al paciente. La Declaración de Helsinki es la declaración más conocida de la Asociación Médica Mundial, fue adoptada en 1964 y ha sido enmendada cinco veces, la última en el año 2000; en el 2002 se le agregó una nota de clarificación al párrafo 29 y otra al párrafo 30 en el 2004. Entendemos que la actual versión (64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013) es la única oficial, todas las versiones anteriores han sido reemplazadas y no serán utilizadas o citadas, excepto para fines históricos.

Debido a que en el estudio clínico se utilizarán péptidos para pulsar las DCs autólogas en cada paciente y el péptido hace parte de la vacuna que se le suministrará al paciente, en la realización de esta parte del proyecto, además de todas las consideraciones ya mencionadas, se deberá observar y cumplir con la norma que en materia de legislación colombiana está contenida en la resolución No 2378 de 2008 que aplica para el desarrollo de este estudio. En consecuencia, el protocolo de investigación deberá ser sometido a evaluación por un Comité de Ética que cuente con aval del INVIMA (en este caso acudiremos al Comité del Instituto Nacional de Cancerología el cual avaló y aprobó el proyecto actualmente en marcha con Células Dendríticas en pacientes con cáncer de mama en terapia neo-adyuvante). De acuerdo a la resolución 2378 este comité será encargado de auditar el adecuado desarrollo del estudio clínico en todos los componentes esenciales señalados por esta norma como son: Comité de Ética, Archivo del Investigador y el Patrocinador. Cualquier efecto adverso serio que experimente una de las participantes dentro del estudio será notificado de inmediato por el Investigador Principal al Comité de Ética.

Por tratarse de un estudio clínico Fase I este no podrá ser iniciado hasta tanto el protocolo detallado no sea aprobado por parte del INVIMA. Estimamos que obtener dicha aprobación demandará un tiempo considerable de por lo menos 1 año, por lo cual una vez aprobado el proyecto por COLCIENCIAS y simultáneamente con el desarrollo del estudio PRECLINICO el cual fue avalado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, se dará inicio a ese proceso con la radicación del protocolo del ensayo clínico ante el INVIMA con el fin de que este sea revisado y avalado por esta institución. Confiamos que una vez terminado los estudios in-silico e in-vitro se tendrá la aprobación por el



INVIMA para poder proceder con la fase clínica del estudio.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Es responsabilidad de los investigadores obtener el consentimiento informado escrito del paciente (o del representante legal del paciente) luego de una adecuada explicación de los objetivos, métodos, beneficios anticipados y peligros potenciales del estudio, antes de que cualquier tratamiento relacionado con el estudio sea administrado. El paciente debe recibir una copia de la documentación del consentimiento informado y la copia original debe ser almacenada en los registros de la institución, sujeta a inspección por representantes del patrocinador o de entes reguladores (ver consentimientos informados anexos).

### Requerimientos de documentación pre-estudio

Los siguientes documentos son requeridos antes de que un agente en investigación sea evaluado en el presente estudio clínico:

Página firmada del protocolo aprobado.

Copia del formato de consentimiento informado aprobado.

Copia de la aprobación de Comité de Ética y Comité de Dirección del Proyecto / Comité de ética externo y aprobación reguladora local, si fuese requerida para el protocolo y consentimiento informado.

Hoja de vida del Investigador Principal y Co-Investigadores.

Rangos normales de laboratorio y documentación de la certificación del laboratorio.

Si es requerido, aprobación para importar agentes en investigación

### Confidencialidad del paciente

El investigador debe asegurar de que la privacidad del paciente es mantenida. En el caso de los formatos de reporte u otros documentos dados a un tercero ya que estrictamente hablando en este estudio no existe un Patrocinador, los pacientes deben ser identificados por sus iniciales y un número de estudio de paciente, solamente. Los documentos del archivo del investigador deben ser mantenidos por el Investigador en un archivo con estricta confidencialidad.

El investigador deberá permitir al monitor del estudio clínico y en general a representantes de entidades reguladoras revisar aquella parte(s) de los registros médicos del paciente que está directamente relacionada con el estudio. Como parte del contenido requerido del consentimiento informado, el paciente debe ser informado de que sus registros serán revisados de esta manera.

### Monitoria

Se entiende que un monitor y/o personal autorizado puede entrar en contacto y visitar al investigador, y que al monitor se le permitirá acceso directo a documentos y fuentes de datos para la supervisión de registro de la información relacionada con el ensayo, auditorías, revisión por el Comité de Ética o inspecciones reguladoras. El acceso directo se define como el permiso para examinar, analizar, verificar, y reproducir cualquier registro y reportes que sean importantes para la evaluación de un ensayo clínico. Como se ha mencionado antes, se deben tener todas las precauciones necesarias para mantener la seguridad y la confidencialidad de las identidades y de la información consignada en la historia clínica de los sujetos que participan en el estudio. Es responsabilidad del monitor inspeccionar los formatos de reportes de caso a intervalos regulares a través del estudio para verificar la adherencia al protocolo, lo completo, exactitud y consistencia de los datos y la adherencia a las guías de Buenas Prácticas Clínicas. El monitor debe tener acceso a cartas de los pacientes, reportes de laboratorio y otros registros de pacientes necesarios para verificar las entradas a los formatos de reporte de caso.

Donde las reglas locales no permitan acceso directo a las fuentes de datos, el monitor verificará entradas en los formatos de reporte de caso haciendo preguntas directas de una persona con el acceso autorizado a las fuentes de datos. El investigador acuerda cooperar con el monitor para asegurar que cualquier problema detectado durante el curso de estas visitas de supervisión está resuelto.

Para efectos de la auditoría de los ensayos clínicos por monitores especializados, en el presente trabajo se tiene contemplada la contratación de entidades especializadas en dar este tipo apoyo a la gestión del proyecto de investigación.

---

## LICENCIAS AMBIENTALES CONSULTA PREVIA Y CONTRATO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y/O PRODUCTOS DERIVADOS (SI APLICA)

No aplica

---

### CARÁCTER NOVEDOSO DEL PROYECTO

Desde el año 2014, las vacunas personalizadas como las que proponemos implementar en este estudio son una opción real para la inmunoterapia del cáncer [6, 8, 9, 20, 57]. Ellas se basan en secuencias de aminoácidos que comprenden mutación puntual de un aminoácido las cuales las convierten en verdaderos neo-antígenos que pueden ser identificadas gracias a las ciencias “ómicas” y al desarrollo de métodos bioinformáticos que permiten la predicción de epítopes capaces de estimular la respuesta de linfocitos T [68]. En un proyecto que toma 8 semanas es posible ir desde la identificación del universo de mutaciones a la síntesis y vacunación con péptidos sintéticos con una vacuna personalizada en pacientes con cáncer (comunicación personal del Profesor Robert D. Schreiber en la Universidad de Washington en Saint Louis líder en la implementación de este tipo de vacunas). En el marco de un convenio de cooperación firmado por el investigador Principal de este proyecto por la Universidad Nacional de Colombia y el Profesor Emil Unanue nuestro interlocutor del Programa de Inmunología de la Universidad de Washington en Saint Louis (ver convenio anexo), tenemos la posibilidad de contar con el apoyo del Profesor Schreiber como consultor en este proyecto (ver carta anexa).

En contraste con lo intentado hasta ahora, los neo-péptidos que se persiguen identificar en este trabajo son verdaderos neo-antígenos tumorales para los cuales los linfocitos T del paciente no son tolerantes. Este proyecto es una apuesta a la validación de la utilidad de las vacunas sintéticas basadas en péptidos de 19 a 25 aminoácidos para controlar tumores. Los algoritmos utilizados en la aproximación experimental propuesta por nosotros han demostrado en otros trabajos que posibilita la selección dentro de los neo-antígenos tumorales de epítopes cuya preservación a la actividad del proteosoma y de alta afinidad por la molécula HLA-A\*02:01 está asegurada y que por su longitud incorpora la posibilidad de generar tanto linfocitos T CD8+ como linfocitos T CD4+ útiles en el control de tumores como melanoma demostrado recientemente Schumacher y col., utilizando este tipo de vacunas [8].

La eficacia de DCs como adyuvante natural individualizado en vacunas terapéuticas contra el cáncer ha sido discreta, sin embargo, por su importancia como adyuvante natural, en nuestro laboratorio hemos dedicado importantes esfuerzos orientados a mejorar la inmunocompetencia de estas células. Con el apoyo de la Fundación Salud de los Andes (entidad del sector privado que apoya el desarrollo del presente proyecto) hemos podido poner a punto la generación en condiciones de buenas prácticas clínicas y de laboratorio la producción para uso en inmunoterapia de dos tipos de DCs, una de las cuales tiene la capacidad de estimular linfocitos T de memoria con características (stem) y la otra en generar respuestas de linfocitos T efectoras con importante actividad anti-tumoral [43].

Actualmente adelantamos el primer estudio clínico de inmunoterapia en cáncer con DCs el cual nos ha permitido demostrar que las DCs producidas son seguras e inmunogénicas. Nosotros las hemos utilizado con éxito para hacer estimulación primaria de linfocitos T vírgenes contra antígenos tumorales in vitro de personas sanas, algo que ya se está explorando con propósitos de inmunoterapia en pacientes con melanoma [20]. Por lo anterior, en el caso que no logremos rescatar de ninguna de las epítopes predichas linfocitos T CD8 específicos en las pacientes, trataríamos de obtener in vitro linfocitos T anti-tumorales específicos para las neo-epítopes. Una

vez demostrado que el repertorio de células vírgenes de estas pacientes posee linfocitos T específicos contra las epítopes predichas, estaría indicada su vacunación con estas epítopes en busca de que con la vacunación logremos demostrar el repertorio de linfocitos T vírgenes específicos para la epítope predicha expanda en estas pacientes.

En este contexto confiamos que con nuestra idea de vacunar a las pacientes luego de haber completado seis meses de terapia neo-adyuvante estamos permitiendo que los linfocitos T anti-tumorales específicos contra los neo-antígenos que utilizaremos como vacuna, una vez liberados de la supresión como resultado de la quimioterapia neo-adyuvante, nos va a permitir expansión eficiente de estos linfocitos anti-tumorales de manera eficiente facilitándonos su detección y el monitoreo de su fenotipo anti-tumoral durante y luego de la vacunación (cuarto objetivo específico de este trabajo).

Por todo lo anterior consideramos que las metodologías que van a ser utilizadas para obtener vacunas sintéticas personalizadas y que perseguimos implementar en este trabajo requiere el desarrollo de metodologías robustas de ciencias ómicas y de bio-informática en la frontera del conocimiento que representan un importante desafío para nosotros. Sin embargo, confiamos que con la participación de co-investigadores (Profesor Jovanny Zabaleta y Luis Fernando Niño) y la interlocución con los Profesores Pedro Romero quien es líder en el campo de vacunación con péptidos en pacientes con cáncer y Robert D. Schreiber, pionero de las vacunas personalizadas en cáncer [7] como consultores (ver sendas cartas de intención anexas), está a nuestro alcance el poder desarrollar este ambicioso proyecto en Colombia. Si se tiene en cuenta (i) el desafío que representa implementar por nosotros en Colombia este tipo de vacunas como alternativa terapéutica para un tumor como el de pacientes con CMTN; (ii) el grupo selecto de Profesores investigadores convocados quienes cuentan con las credenciales necesarias para ejecutar y asesorar el desarrollo de un proyecto de esta naturaleza y (iii) la incursión en las lides de la inmunoterapia de cáncer desde hace ya 8 años, consideramos que estamos frente a una oportunidad histórica de poder llevar a cabo este proyecto en la frontera del conocimiento para el bien de las pacientes con cáncer de Colombia y de la región.

---

## DEFINICIÓN Y APROXIMACIÓN AL MERCADO

En este proyecto proponemos la implementación de potentes metodologías bio-informáticas para la detección del universo de mutaciones de un tumor y para el diseño de vacunas personalizadas hechas a la medida de cada paciente en pacientes con cáncer de mama triple negativas (CMTN), un tumor que debido a su inestabilidad genética posee alta tasa de mutaciones, alto nivel de recaídas y en el que por cerca de 50 años no ha habido avances significativos en su manejo y tratamiento. El lograr la implementación de la metodología necesaria para implementar el diseño y producción de vacunas sintéticas personalizadas como estrategia de inmunoterapia en pacientes con este tipo de cáncer - lo cual no ha sido realizado por ningún grupo de investigación hasta ahora - posicionaría al país en la frontera del conocimiento en este tipo de investigación aplicada. Por la efectividad de los métodos bio-informáticos que serán utilizados consideramos va a ser posible identificar varios péptidos en cada paciente con capacidad de inducir respuestas anti-tumorales potentes en las pacientes vacunadas. Si bien el impacto de este tipo de vacunas en la respuesta clínica de largo plazo no podrá ser valorado por las características del presente estudio (estudio clínico Fase I en que se evalúa inmunogenicidad y seguridad de las vacunas producidas en un periodo de tres años), el estandarizar toda una serie de metodologías necesarias para obtener dichas vacunas haría posible su producción a escala de mercado en un futuro cercano con posibilidad de mercado muy amplias para pacientes con CMTN Colombianas y de países de la región susceptible de ser aplicada metodología para producir vacunas personalizadas contra cualquier tumor.

La aplicación de vacunas personalizadas luego del tratamiento por seis meses con quimioterapia neo-adyuvante con Doxorubicina, Ciclofosfamida seguido por Taxanos en las pacientes lo consideramos una verdadera fortaleza de nuestro estudio por las siguientes razones: (i) este régimen de quimioterapia es de muy bajo costo y es popularmente utilizado para el manejo de estas pacientes en la clínica quienes suelen dar respuestas patológicas objetivas en el corto plazo pero que desafortunadamente recaen rápidamente; (ii) evidencias del trabajo en nuestro laboratorio demuestran que contrario a la creencia del efecto inmuno-supresor de estos agentes de quimioterapia administrada de manera neo-adyuvante tiene un potente efecto inmuno-estimulador de la respuesta inmunológica contra el tumor [1] y (Parra-López C. 2017 EMJ Reviews 2017 - sometido); (iii) por la alta tasa de mutaciones consideramos que muy probablemente la identificación de neo-epítopes en el cáncer de mama triple negativa va a tener un alto rendimiento en la identificación de neo-antígenos capaces de estimular eficientemente a los linfocitos T anti-tumorales en las pacientes vacunadas pos-quimioterapia. Por todo lo anterior, es muy posible que por el papel inmuno-estimulador de la respuesta inmune de la quimioterapia haga que la vacunación luego de la quimioterapia con estas vacunas personalizadas favorezca la expansión de linfocitos anti-tumorales de memoria que disminuyan el riesgo de recaídas y la enfermedad sistémica con metástasis en estas pacientes.

Consideramos que la vacunación luego de la quimioterapia representa una estrategia innovadora que obvia los altos costos de herramientas comerciales disponibles que son utilizadas concomitantemente con vacunas en otros tumores para restablecer la vigilancia de los tumores y la respuesta a las vacunas pero que son prohibitivamente costosos como lo son los anticuerpos anti-CTLA4; anti-PD1 y anti-PDL1. La utilización luego de la quimioterapia del tipo de vacuna como las que serán generadas en este estudio para la inmunoterapia de cáncer consideramos podría significar un nuevo uso para viejos agentes de quimio-terapia en el que su uso combinado con estas vacunas signifique una verdadera revolución en el campo de la inmunoterapia con la cual se pudiese disminuir la alta tasa de morbi-mortalidad de tumores como el CMTN que representa el 20% de los casos de cáncer de mama pero a su vez de otros tumores en los que la terapia neo-adyuvante con estos fármacos es ampliamente utilizada. El implementar entre nosotros la metodología necesaria para obtener estas vacunas tendría un importante impacto no solo en el manejo del CMTN en mujeres cada vez más jóvenes sino de otros tumores de mal pronóstico como los tumores de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, de esófago, páncreas y glioblastoma los cuales si bien no son los más frecuentes en nuestro país los pacientes con estas patologías si están a la espera de alternativas de tratamiento que mejoren no solo sus expectativas de vida libre de enfermedad luego de la quimioterapia con estos fármacos sino además de tratamientos más altamente específicos como lo son las vacuna individualizadas que les brinde una mejor calidad de vida a estos pacientes durante su tratamiento.

## PROPIEDAD INTELECTUAL

El manejo de propiedad intelectual de los resultados obtenidos con el desarrollo del presente proyecto se basa en el acuerdo de propiedad intelectual previamente firmado por las entidades participantes (ver anexo – propiedad intelectual).

## Impactos

Tipo Impacto	Descripción	Año Esperado
IMPACTOS REGIONALES	Con los resultados obtenidos al final de todo el proyecto, esperamos estandarizar el reconocimiento de neo-epítopes en Colombia y con esto	2022

	impactar los protocolos de tratamiento contra el cáncer en la ciudad de Bogotá.	
IMPACTOS EN EL CONOCIMIENTO DEL CAMPO DE ESTUDIO	Se espera la socialización de todos los resultados obtenidos en el presente proyecto con la publicación de artículos y la participación en congresos científicos.	2021
IMPACTOS SOBRE EL MEDIO AMBIENTE Y LA SOCIEDAD	El manejo de desechos y residuos químicos y biológicos que se generen se hará de acuerdo a los estándares establecidos para la protección del medio ambiente y siguiendo las normativas de bioseguridad y protección de individuos que participan en actividades de investigación tanto en el Laboratorio de Equipos Comunes ubicado en el tercer piso (Edificio 471) de la Facultad de Medicina en Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia como en los centros de salud (Hospital Universitario Nacional) u otros posibles participantes.	2020
IMPACTOS DE CIENCIA, TECNOLOGIA O INNOVACIÓN	Con los resultados obtenidos al final de proyecto, se espera la publicación de artículos, la participación en congresos y la formación de estudiantes a nivel de maestría y doctorado.	2020

## Coberturas

- ◆ BOGOTA D.C. - 100 %

## Productos

### Generación de nuevo conocimiento

Subtipo Producto	Producto	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Artículo de investigación	Artículos categoría A1	Dos artículos publicados en revista internacional indexada	2	Comunidad científica especializada en inmunoterapia y cáncer

### Desarrollo Tecnológico e innovación

Subtipo Producto	Producto	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Producto empresarial	Innovaciones en procesos y servicios	Desarrollo de proceso de identificación de epítopes inmunogénicas para síntesis y vacunación con células dendríticas autólogas.	1	Comunidad general, mujeres con cáncer de mama triple negativo (pacientes con mayor grado de morbi-mortalidad)

### Apropiación Social del Conocimiento

Subtipo Producto	Resultado	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Productos de	PONENCIAS	Participación en ponencias científicas de temas	1	Integrantes de los

apropiación social del conocimiento		relacionados con inmunoterapia de cáncer		investigadores participantes y/o estudiantes de posgrado de la Universidad Nacional de Colombia
-------------------------------------	--	--	--	---

## Formación Recurso Humano

Subtipo Producto	Formación	Descripción	Numero Personas	Beneficiario
Estudiante de doctorado	Vinculación de estudiantes de doctorado	Vinculación de un estudiante de doctorado en el programa de Ciencias biomédicas de la U.N.	1	Estudiantes de posgrados interesados en investigación clínica y básica
Estudiante de maestría	Formación de estudiantes de maestría	Formación de dos estudiantes de maestría en áreas de ciencia básicas y aplicadas en la U.N.	2	Un estudiante de maestría en química de la Facultad de Ciencias y un estudiante de maestría en Ingeniería Biomédica de la U.N.

## Personal

### Tipo Personal

Tipo Personal	Cantidad
ESTUDIANTE PREGRADO	2
INVESTIGADOR PRINCIPAL	1
ASESOR INTERNACIONAL	2
ESTUDIANTE DOCTORADO	1
ESTUDIANTE MAESTRIA	2
COINVESTIGADOR	8

### Personal

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	INVESTIGADOR PRINCIPAL		
<b>Nombres:</b>	CARLOS ALBERTO		
<b>Primer Apellido:</b>	PARRA	<b>Segundo Apellido:</b>	LOPEZ
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de</b>	1956-09-23

<b>País:</b>	Colombia	<b>Nacimiento:</b>	
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE EXTRANJERIA	<b>Email:</b>	caparral@unal.edu.co
<b>Función en el Proyecto:</b>		<b>Número Documento:</b>	19353881
<b>Duración Horas Semanales:</b>	10	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	COINVESTIGADOR		
<b>Nombres:</b>	LUIS FERNANDO		
<b>Primer Apellido:</b>	NIÑO	<b>Segundo Apellido:</b>	VASQUEZ
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	1989-01-06
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	lfnino@unal.edu.co
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	79436297
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	2	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	COINVESTIGADOR		
<b>Nombres:</b>	RAMIRO		
<b>Primer Apellido:</b>	SANCHEZ	<b>Segundo Apellido:</b>	RAMIREZ
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	ramirosanchezmd@gmail.com
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	73070828
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	2	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	ASESOR INTERNACIONAL		
<b>Nombres:</b>	PEDRO		
<b>Primer Apellido:</b>	ROMERO	<b>Segundo Apellido:</b>	
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Suiza	<b>Email:</b>	Pedro.Romero@hospvd.ch
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	123456



<b>Función en el Proyecto:</b>	asesor internacional en el uso de peptidos sintéticos como vacuna en pacientes con cáncer		
<b>Duración Horas Semanales:</b>	2	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	ESTUDIANTE DOCTORADO		
<b>Nombres:</b>	PhD		
<b>Primer Apellido:</b>	Estudiante 1	<b>Segundo Apellido:</b>	
<b>Género:</b>	Femenino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	estudianteph1@unal.edu.co
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	12345678

<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	30	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	ESTUDIANTE MAESTRIA		
<b>Nombres:</b>	Maestria		
<b>Primer Apellido:</b>	Estudiante 1	<b>Segundo Apellido:</b>	
<b>Género:</b>	Femenino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	estudiante1maestria@unal.edu.co
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	1234567890

<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	30	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	FUNDACION SALUD DE LOS ANDES		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	COINVESTIGADOR		
<b>Nombres:</b>	DAVID ANDRES		
<b>Primer Apellido:</b>	BERNAL	<b>Segundo Apellido:</b>	ESTEVEZ
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	1982-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	dbernal.investigacion@saluddelosandes.com
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	80184109

<b>Función en el Proyecto:</b>	Procesamiento de aféresis, inmuno-monitoreo, análisis por citometría de flujo, analisis de resultados, análisis estadísticos, redacción de informes, escritura de manuscritos.		
<b>Duración Horas Semanales:</b>	13	<b>Número de Meses:</b>	36

**Semanales:**

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	ESTUDIANTE PREGRADO		
<b>Nombres:</b>	Pregrado		
<b>Primer Apellido:</b>	Estudiante 1	<b>Segundo Apellido:</b>	
<b>Género:</b>	Femenino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	eatudiante1@unal.edu.co
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	123456789
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	20	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	ESTUDIANTE PREGRADO		
<b>Nombres:</b>	Pregrado		
<b>Primer Apellido:</b>	Estudiante 2	<b>Segundo Apellido:</b>	
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	eatudiante2@unal.edu.co
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	1234567891
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	20	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	ASESOR INTERNACIONAL		
<b>Nombres:</b>	JOVANNY		
<b>Primer Apellido:</b>	ZABALETA	<b>Segundo Apellido:</b>	
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Estados Unidos	<b>Email:</b>	jzabal@lsuhsc.edu
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	1234567
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	2	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	COINVESTIGADOR		

<b>Nombres:</b>	RAFAEL ENRIQUE		
<b>Primer Apellido:</b>	TEJADA	<b>Segundo Apellido:</b>	CABRERA
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	rafaeltejadacabrera@gmail.com
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	8705450
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	2	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	COINVESTIGADOR		
<b>Nombres:</b>	ANA MARIA		
<b>Primer Apellido:</b>	MEJIA	<b>Segundo Apellido:</b>	MUNERA
<b>Género:</b>	Femenino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	anamariamejia@gmail.com
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	43616220
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	2	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	ESTUDIANTE MAESTRIA		
<b>Nombres:</b>	Maestria		
<b>Primer Apellido:</b>	Estudiante 2	<b>Segundo Apellido:</b>	
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	estudiante2maestria@unal.edu.co
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	2123456789
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	30	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	FUNDACION SALUD DE LOS ANDES		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	COINVESTIGADOR		
<b>Nombres:</b>	MAUREN ANDREA		
<b>Primer Apellido:</b>	ORTIZ	<b>Segundo Apellido:</b>	BARBOSA
<b>Género:</b>	Femenino	<b>Fecha de</b>	1986-01-06

<b>País:</b>	Colombia	<b>Nacimiento:</b>	
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Email:</b>	maaortizba@unal.edu.co
<b>Función en el Proyecto:</b>		<b>Número Documento:</b>	1010163997
<b>Duración Horas Semanales:</b>	20	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	COINVESTIGADOR		
<b>Nombres:</b>	JOSE NESTOR		
<b>Primer Apellido:</b>	SUAREZ	<b>Segundo Apellido:</b>	SUAREZ
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	js.nestor@gmail.com
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	19365283
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	2	<b>Número de Meses:</b>	36

<b>Entidad:</b>	SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE		
<b>Vinculación Proyecto:</b>	COINVESTIGADOR		
<b>Nombres:</b>	RENE ALEJANDRO		
<b>Primer Apellido:</b>	BURGOS	<b>Segundo Apellido:</b>	ALARCON
<b>Género:</b>	Masculino	<b>Fecha de Nacimiento:</b>	2009-01-01
<b>País:</b>	Colombia	<b>Email:</b>	renealejandroburos@hotmail.com
<b>Tipo Documento:</b>	CEDULA DE CIUDADANIA	<b>Número Documento:</b>	19325276
<b>Función en el Proyecto:</b>			
<b>Duración Horas Semanales:</b>	2	<b>Número de Meses:</b>	36

## Cronograma

Número	Actividad	Inicio	Final	Tiempo
1	Tamizaje pacientes que cumplan criterios de inclusión (40)	1	11	Meses
2	Proceso de vinculación de pacientes (10)	1	11	Meses
3	Comprobación criterios de inclusión	1	11	Meses
4	Firma consentimiento informado	1	11	Meses

5	Realización de exámenes de laboratorio	1	11	Meses
6	Tipificación fina de HLA	1	13	Meses
7	1. Leucoféresis	1	13	Meses
8	Biopsia (trucut)	1	11	Meses
9	Quimioterapia esquema A/C	2	14	Meses
10	Servicio secuenciamiento exoma/Transcriptoma	2	16	Meses
11	Depuración base de datos secuencias	2	16	Meses
12	Detección de mutaciones puntuales	2	17	Meses
13	Identificación de epítopes	2	18	Meses
14	Análisis de clivaje	2	18	Meses
15	Caracterización de unión de epítopes a HLA	3	18	Meses
16	Determinación de epítopes candidatas	3	18	Meses
17	Generación de DCs y congelación	3	16	Meses
18	Generación línea células LT-CD8	3	17	Meses
19	Análisis in vitro respuesta inmune	3	20	Meses
20	Selección pacientes (5) fase clínica	12	17	Meses
21	2. Leucoféresis	12	17	Meses
22	Muestra de tejido cirugía	6	17	Meses
23	Servicio secuenciamiento exoma	6	17	Meses
24	Generación de DCs y congelación	12	20	Meses
25	Generación línea células LT-CD8	15	22	Meses
26	Análisis in silico	12	22	Meses
27	Análisis in vitro	15	23	Meses
28	Servicio síntesis de péptidos (GMP)	15	23	Meses
29	Producción vacunas sintéticas personalizadas	15	23	Meses
30	Vacunación de pacientes	16	23	Meses
31	Evaluación efectos adversos y evolución	15	35	Meses
32	Muestra de sangre	17	27	Meses
33	3. Leucoféresis	26	30	Meses
34	Inmunomonitorio	12	34	Meses
35	Análisis in vitro	12	34	Meses
36	Informe técnico y financiero de avance	12	15	Meses
37	Escritura de manuscritos	32	36	Meses

38	Vinculación de estudiantes y desarrollo de tesis de doctorado / Maestrías	1	36	Meses
39	Divulgación de resultados (Posters o presentación oral)	17	22	Meses
40	Pasantías a universidades e institutos internacionales	17	22	Meses
41	Informe final	33	36	Meses

## Rubros

Rubro	Financiado	Contrapartida en Efectivo	Contrapartida en Especie	Valor Total
CONSULTORÍAS ESPECIALIZADAS, ESTUDIOS DE VIGILANCIA	\$ 10.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 10.000.000
EQUIPOS	\$ 15.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 15.000.000
GASTOS DE OPERACIÓN	\$ 33.360.000	\$ 0	\$ 0	\$ 33.360.000
MATERIALES E INSUMOS	\$ 166.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 166.000.000
PERSONAL CIENTÍFICO	\$ 0	\$ 0	\$ 535.004.736	\$ 535.004.736
PUBLICACIONES	\$ 5.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 5.000.000
SERVICIOS TECNICOS	\$ 345.000.000	\$ 0	\$ 200.000.000	\$ 545.000.000
VIAJES	\$ 25.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 25.000.000
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 599.360.000</b>	<b>\$ 0</b>	<b>\$ 735.004.736</b>	<b>\$ 1.334.364.736</b>

## Rubros Entidad

Entidad: FUNDACION SALUD DE LOS ANDES

Rubro	Descripción	Justificación	Entidad Financiadora	Financiado	%	Efectivo	%	Especie	%	Valor Total
PERSONAL CIENTÍFICO	DAVID ANDRES BERNAL ESTEVEZ	Procesamiento de aféresis, inmuno-monitoreo, análisis por citometría de flujo, analisis de resultados, análisis estadísticos, redacción de informes, escritura de manuscritos.	COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 90.720.000	100	\$ 90.720.000
PERSONAL CIENTÍFICO	MAUREN ANDREA ORTIZ BARBOSA		COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 176.904.000	100	\$ 176.904.000
SERVICIOS TECNICOS	Uso area blanca para generacion de células dendríticas para uso en humanos	Se requiere de un area con calidad para el cultivo y diferenciacion de células dendríticas autólogas para su posterior uso en las vacunas de las pacientes	COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 120.000.000	100	\$ 120.000.000
<b>TOTAL</b>				<b>\$ 0</b>		<b>\$ 0</b>		<b>\$ 387.624.000</b>		<b>\$ 387.624.000</b>

Entidad: SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE



Rubro	Descripción	Justificación	Entidad Financiadora	Financiado	%	Efectivo	%	Especie	%	Valor Total
PERSONAL CIENTÍFICO	RENE ALEJANDRO BURGOS ALARCON		COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 4.754.880	100	\$ 4.754.880
PERSONAL CIENTÍFICO	ANA MARIA MEJIA MUNERA		COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 27.360.000	100	\$ 27.360.000
PERSONAL CIENTÍFICO	JOSE NESTOR SUAREZ SUAREZ		COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 9.766.080	100	\$ 9.766.080
<b>TOTAL</b>				<b>\$ 0</b>		<b>\$ 0</b>		<b>\$ 41.880.960</b>		<b>\$ 41.880.960</b>

**Entidad: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

Rubro	Descripción	Justificación	Entidad Financiadora	Financiado	%	Efectivo	%	Especie	%	Valor Total
CONSULTORÍAS ESPECIALIZADAS, ESTUDIOS DE VIGILANCI	Consultoría especializada	Consultoria del Dr. Pedro Romero, experto en inmunoterapia de cáncer y vacunación con peptidos sintéticos	COLCIENCIAS	\$ 10.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 10.000.000
EQUIPOS	Estaciones de trabajo	Equipos de cómputo con sistema Linux o Mac para análisis genómico y bioinformático para la detección de mutaciones únicas no sinónimas	COLCIENCIAS	\$ 15.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 15.000.000
GASTOS DE OPERACIÓN	Gastos de operación (6% del total solicitado)	Este es el costo de operación por parte de la Universidad Nacional de Colombia	COLCIENCIAS	\$ 33.360.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 33.360.000
MATERIALES E INSUMOS	Kit para procesamiento de leucaferesis por el cual se toma la muestra de sangre previo y posterior a la quimioterapia de 10 pacientes (total de 20 aféresis)	Se requiere de la compra de los kit sellados y estériles de leucaferesis para la obtención de grandes cantidades de células en un poco volumen de sangre.	COLCIENCIAS	\$ 35.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 35.000.000
MATERIALES E INSUMOS	Medios de cultivo y separación celular	Medio de cultivo AIM-V calidad GMP, ficoll para purificación de células mononucleares de sangre periférica y medios de lavado GMP	COLCIENCIAS	\$ 18.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 18.000.000
MATERIALES E INSUMOS	Kits de anticuerpos para citometría de flujo	caracterización del fenotipo de células por citometría de flujo (activación, especificidad - tetrameros-, memoria)	COLCIENCIAS	\$ 39.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 39.000.000
MATERIALES E INSUMOS	CBA para citoquinas humanas Th1/Th2	Kit de cuantificación de citoquinas humanas por método de CBA (citometría de flujo) para la evaluación de la activación de células en respuesta a los peptidos personalizados	COLCIENCIAS	\$ 13.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 13.000.000
MATERIALES E INSUMOS	Material plástico estéril desechable para cultivo in vitro	Material necesario para procesamiento estéril de muestras de sangre y tejido para obtención de células y DNA/RNA para secuenciación.	COLCIENCIAS	\$ 20.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 20.000.000
MATERIALES E INSUMOS	Citoquinas GMP para generación de Células Dendríticas	Se requiere de la compra de citoquinas calidad GMP para uso en humanos con el fin de inducir y madurar células dendríticas autólogas las cuales servirán como adyuvantes propios para la presentación de los péptidos con las mutaciones puntuales del tumor.	COLCIENCIAS	\$ 41.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 41.000.000
PERSONAL CIENTÍFICO	RAFAEL ENRIQUE TEJADA CABRERA		COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 25.669.920	100	\$ 25.669.920
PERSONAL	RÁMIRO		COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 25.916.928	100	\$ 25.916.928

CIENTÍFICO	SANCHEZ RAMIREZ										
PERSONAL CIENTÍFICO	CARLOS ALBERTO PARRA LOPEZ		COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 139.662.720	100	\$ 139.662.720	
PERSONAL CIENTÍFICO	LUIS FERNANDO NIÑO VASQUEZ		COLCIENCIAS	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 34.250.208	100	\$ 34.250.208	
PUBLICACIONES	Pago de los derechos de publicación de artículo en revista internacional indexada	Se requiere del pago de los derechos de publicación para los artículos que se deriven del desarrollo del estudio clínico	COLCIENCIAS	\$ 5.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 5.000.000	
SERVICIOS TECNICOS	Síntesis de tetrámeros HLA-A*02:01	Síntesis de un tetrámero específico para cada uno de los péptidos identificados con el fin de poder hacer seguimiento y caracterización de linfocitos T específicos contra el péptido específico.	COLCIENCIAS	\$ 19.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 19.000.000	
SERVICIOS TECNICOS	Servicio de secuenciación exoma y transcriptoma	Se requiere del pago de los servicios de secuenciación del exoma y transcriptoma de las muestras tumorales y de sangre (control) tanto antes como después de la quimioterapia.	COLCIENCIAS	\$ 88.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 88.000.000	
SERVICIOS TECNICOS	Servicio de laboratorio de equipos comunes	Pago por servicios de los equipos pertenecientes al laboratorio de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia	COLCIENCIAS	\$ 29.000.000	39	\$ 0	0	\$ 45.000.000	60	\$ 74.000.000	
SERVICIOS TECNICOS	Síntesis de péptidos pre-clínicos	Síntesis química de las secuencias de péptidos candidatas identificadas en las mutaciones de cada una de las pacientes	COLCIENCIAS	\$ 48.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 48.000.000	
SERVICIOS TECNICOS	Servicio de Citometría de flujo	Análisis multidimensional de marcadores de respuesta inmune (inmuno-monitoreo)	COLCIENCIAS	\$ 8.000.000	18	\$ 0	0	\$ 35.000.000	81	\$ 43.000.000	
SERVICIOS TECNICOS	Tipificación en alta resolución de los alelos HLA	Se requiere de la confirmación de la presencia del alelo específico HLA-A*02:01 en las pacientes participantes para la selección de los péptidos candidatos.	COLCIENCIAS	\$ 15.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 15.000.000	
SERVICIOS TECNICOS	Síntesis de péptidos GMP	Síntesis química de péptidos con calidad GMP para uso en humanos los cuales serán empleados para pulsar las células dendríticas autólogas y su posterior vacunación vía intradérmica	COLCIENCIAS	\$ 138.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 138.000.000	
VIAJES	Congreso internacional	Participación de dos personas a congresos internacionales relacionados con el ensayo clínico con el fin de presentar resultados	COLCIENCIAS	\$ 25.000.000	100	\$ 0	0	\$ 0	0	\$ 25.000.000	
<b>TOTAL</b>				\$ 599.360.000		\$ 0		\$ 305.499.776		\$ 904.859.776	

## Detalles Rubros

### Cuadro: CONSULTORÍAS ESPECIALIZADAS

Descripción	Justificación	Proveedor	Entidad	Financiado	Efectivo	Especie	Valor Total
-------------	---------------	-----------	---------	------------	----------	---------	-------------

Consultoría especializada	Consultoría del Dr. Pedro Romero, experto en inmunoterapia de cáncer y vacunación con peptidos sintéticos		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 10.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 10.000.000
<b>TOTAL</b>				\$ 10.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 10.000.000

#### Cuadro: EQUIPOS

Descripción	Justificación	Proveedor	Entidad	Financiado	Efectivo	Especie	Valor Total
Estaciones de trabajo	Equipos de cómputo con sistema Linux o Mac para análisis genómico y bioinformático para la detección de mutaciones únicas no sinónimas		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 15.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 15.000.000
<b>TOTAL</b>				\$ 15.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 15.000.000

#### Cuadro: GASTOS DE OPERACIÓN

Descripción	Justificación	Proveedor	Entidad	Financiado	Efectivo	Especie	Valor Total
Gastos de operación (6% del total solicitado)	Este es el costo de operación por parte de la Universidad Nacional de Colombia		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 33.360.000	\$ 0	\$ 0	\$ 33.360.000
<b>TOTAL</b>				\$ 33.360.000	\$ 0	\$ 0	\$ 33.360.000

#### Cuadro: MATERIALES E INSUMOS

Descripción	Justificación	Proveedor	Entidad	Financiado	Efectivo	Especie	Valor Total
Kits de anticuerpos para citometría de flujo	caracterización del fenotipo de células por citometría de flujo (activación, especificidad - tetrameros-, memoria)		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 39.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 39.000.000
Citoquinas GMP para generación de Células Dendríticas	Se requiere de la compra de citoquinas calidad GMP para uso en humanos con el fin de inducir y madurar células dendríticas autólogas las cuales servirán como adyuvantes propios para la presentación de los péptidos con las mutaciones puntuales del tumor.		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 41.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 41.000.000
Kit para procesamiento de leucaferesis por el cual se toma la muestra de sangre previo y posterior a la quimioterapia de 10 pacientes (total de 20 aféresis)	Se requiere de la compra de los kit sellados y estériles de leucaferesis para la obtención de grandes cantidades de células en un poco volumen de sangre.		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 35.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 35.000.000
Material plástico estéril desechable para cultivo in vitro	Material necesario para procesamiento estéril de muestras de sangre y tejido para obtención de células y DNA/RNA para secuenciación.		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 20.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 20.000.000
Medios de cultivo y separación celular	Medio de cultivo AIM-V calidad GMP, ficolll para purificación de células mononucleares de sangre periférica y medios de lavado GMP		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 18.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 18.000.000
CBA para citoquinas humanas Th1/Th2	Kit de cuantificación de citoquinas humanas por método de CBA (citometría de flujo) para la evaluación de la activación de células en respuesta a los péptidos personalizados		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 13.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 13.000.000
<b>TOTAL</b>				\$ 166.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 166.000.000

#### Cuadro: PERSONAL CIENTÍFICO

Descripción	Justificación	Proveedor	Entidad	Financiado	Efectivo	Especie	Valor Total
RAFAEL ENRIQUE TEJADA CABRERA			UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 0	\$ 0	\$ 25.669.920	\$ 25.669.920
RAMIRO SANCHEZ RAMIREZ			UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 0	\$ 0	\$ 25.916.928	\$ 25.916.928
CARLOS ALBERTO PARRA LOPEZ			UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 0	\$ 0	\$ 139.662.720	\$ 139.662.720

LUIS FERNANDO NIÑO VASQUEZ			UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 0	\$ 0	\$ 34.250.208	\$ 34.250.208
ANA MARIA MEJIA MUNERA			SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE	\$ 0	\$ 0	\$ 27.360.000	\$ 27.360.000
JOSE NESTOR SUAREZ SUAREZ			SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE	\$ 0	\$ 0	\$ 9.766.080	\$ 9.766.080
RENE ALEJANDRO BURGOS ALARCON			SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE	\$ 0	\$ 0	\$ 4.754.880	\$ 4.754.880
DAVID ANDRES BERNAL ESTEVEZ	Procesamiento de aféresis, inmuno-monitoreo, análisis por citometría de flujo, análisis de resultados, análisis estadísticos, redacción de informes, escritura de manuscritos.		FUNDACION SALUD DE LOS ANDES	\$ 0	\$ 0	\$ 90.720.000	\$ 90.720.000
MAUREN ANDREA ORTIZ BARBOSA			FUNDACION SALUD DE LOS ANDES	\$ 0	\$ 0	\$ 176.904.000	\$ 176.904.000
<b>TOTAL</b>				\$ 0	\$ 0	\$ 535.004.736	\$ 535.004.736

#### Cuadro: PUBLICACIONES

Descripción	Justificación	Proveedor	Entidad	Financiado	Efectivo	Especie	Valor Total
Pago de los derechos de publicación de artículo en revista internacional indexada	Se requiere del pago de los derechos de publicación para los artículos que se deriven del desarrollo del estudio clínico		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 5.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 5.000.000
<b>TOTAL</b>				\$ 5.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 5.000.000

#### Cuadro: SERVICIOS TECNICOS

Descripción	Justificación	Proveedor	Entidad	Financiado	Efectivo	Especie	Valor Total
Tipificación en alta resolución de los alelos HLA	Se requiere de la confirmación de la presencia del alelo específico HLA-A*02:01 en las pacientes participantes para la selección de los peptidos candidatos.		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 15.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 15.000.000
Servicio de secuenciación exoma y transcriptoma	Se requiere del pago de los servicios de secuenciación del exoma y transcriptoma de las muestras tumorales y de sangre (control) tanto antes como después de la quimioterapia.		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 88.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 88.000.000
Servicio de Citometría de flujo	Análisis multidimensional de marcadores de respuesta inmune (inmuno-monitoreo)		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 8.000.000	\$ 0	\$ 35.000.000	\$ 43.000.000
Síntesis de tetrámeros HLA-A*02:01	Síntesis de un tetrámero específico para cada uno de los peptidos identificados con el fin de poder hacer seguimiento y caracterización de linfocitos T específicos contra el péptido específico.		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 19.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 19.000.000
Servicio de laboratorio de equipos comunes	Pago por servicios de los equipos pertenecientes al laboratorio de equipos comunes de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 29.000.000	\$ 0	\$ 45.000.000	\$ 74.000.000
Síntesis de péptidos GMP	Síntesis química de péptidos con calidad GMP para uso en humanos los cuales serán empleados para pulsar las células dendríticas autólogas y su posterior vacunación vía intradérmica		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 138.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 138.000.000
Síntesis de péptidos pre-clínicos	Síntesis química de las secuencias de péptidos candidatas identificadas en las mutaciones de cada una de las pacientes		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 48.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 48.000.000
Uso area blanca para generacion de células dendríticas para uso en humanos	Se requiere de un area con calidad para el cultivo y diferenciación de células dendríticas autólogas para su posterior uso en las vacunas de las pacientes		FUNDACION SALUD DE LOS ANDES	\$ 0	\$ 0	\$ 120.000.000	\$ 120.000.000

<b>TOTAL</b>			\$ 345.000.000	\$ 0	\$ 200.000.000	\$ 545.000.000
--------------	--	--	----------------	------	----------------	----------------

### Cuadro: VIAJES

Descripción	Justificación	Proveedor	Entidad	Financiado	Efectivo	Especie	Valor Total
Congreso internacional	Participación de dos personas a congresos internacionales relacionados con el ensayo clínico con el fin de presentar resultados		UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 25.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 25.000.000
<b>TOTAL</b>				\$ 25.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 25.000.000

## Rubros por Año

Rubro	Año 1	Año 2	Año 3	Valor Total
MATERIALES E INSUMOS	\$ 60.000.000	\$ 60.000.000	\$ 46.000.000	\$ 166.000.000
PERSONAL CIENTÍFICO	\$ 178.334.912	\$ 178.334.912	\$ 178.334.912	\$ 535.004.736
SERVICIOS TECNICOS	\$ 255.000.000	\$ 255.000.000	\$ 35.000.000	\$ 545.000.000
PUBLICACIONES	\$ 0	\$ 0	\$ 5.000.000	\$ 5.000.000
EQUIPOS	\$ 15.000.000	\$ 0	\$ 0	\$ 15.000.000
VIAJES	\$ 0	\$ 12.500.000	\$ 12.500.000	\$ 25.000.000
CONSULTORÍAS ESPECIALIZADAS, ESTUDIOS DE VIGILANCIA TECNOLÓGICA Y ESTUDIOS DE MERCADO.	\$ 0	\$ 10.000.000	\$ 0	\$ 10.000.000
GASTOS DE ADMINISTRACIÓN	\$ 11.120.000	\$ 11.120.000	\$ 11.120.000	\$ 33.360.000
<b>TOTAL</b>	\$ 519.454.912	\$ 526.954.912	\$ 287.954.912	\$ 1.334.364.736

## Global Total

Entidad	Financiado	%	Especie	%	Efectivo	%	Valor Total
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 599.360.000	66,24	\$ 305.499.776	33,76	\$ 0	0	\$ 904.859.776
SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE	\$ 0	0	\$ 41.880.960	100	\$ 0	0	\$ 41.880.960
FUNDACION SALUD DE LOS ANDES	\$ 0	0	\$ 387.624.000	100	\$ 0	0	\$ 387.624.000
<b>TOTAL</b>	\$ 599.360.000		\$ 735.004.736		\$ 0		\$ 1.334.364.736

## Contrapartida

Entidad	Especie	%	Efectivo	%	Valor Total
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	\$ 305.499.776	100	\$ 0	0	\$ 305.499.776
SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD SUR ESE	\$ 41.880.960	100	\$ 0	0	\$ 41.880.960
FUNDACION SALUD DE LOS ANDES	\$ 387.624.000	100	\$ 0	0	\$ 387.624.000
<b>TOTAL</b>	\$ 735.004.736		\$ 0		\$ 735.004.736

Ciudad: \_\_\_\_\_

Día: \_\_\_\_\_

Mes: \_\_\_\_\_

Año: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma representante legal.