



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Henriques de Sousa Costa Marques

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “mRNA: Nova Terapia No Tratamento do Cancro” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dr.^a Maria Isabel Belchior e do Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Henriques de Sousa Costa Marques

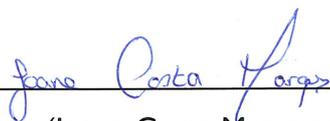
Relatório de Estágio e Monografia intitulada “mRNA: Nova Terapia No Tratamento do Cancro” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Maria Isabel Belchior e do Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2020

Eu, Joana Henriques de Sousa Costa Marques, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015235487, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “mRNA: Nova Terapia No Tratamento do Cancro” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 1 de setembro de 2020.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Joana Costa Marques', is written over a horizontal line.

(Joana Costa Marques)

AGRADECIMENTOS

Aos meus fantásticos pais por sempre me incentivarem a pensar mais além e a ver as adversidades como mais um desafio e não como uma barreira.

À minha irmã que, mesmo nos momentos mais difíceis, se mostrou sempre disponível. Por acreditares em mim e me incentivares a seguir os meus sonhos e ambições quer pessoais como académicas. Sem ti não era a mesma.

Aos meus amigos da faculdade, pelos momentos de lazer e alegria, conversas e pessoas inspiradoras com quem me cruzei durante o meu percurso e que contribuíram para a pessoa que sou hoje.

Um especial obrigado a duas grandes amigas, Inês e Tété, duas raparigas lutadoras, pela coragem que me deram para enfrentar os desafios, pela paciência e sobretudo amizade durante estes 5 anos.

Ao meu orientador Professor Doutor João Nuno Moreira por ser um exemplo de profissionalismo, disponibilidade e excelência. Um sincero agradecimento que, certamente, nunca será suficiente.

À Dra. Maria Isabel Belchior, por toda a confiança que depositou em mim, orientação e, sobretudo, pelos sábios e carinhosos conselhos. A toda a equipa técnica, por todo o apoio, paciência, amabilidade e valiosa transmissão de conhecimentos.

A Coimbra, que me acolhe desde o berço e foi palco de grandes marcos importantes na minha vida. Levo-te para sempre comigo.

O meu sincero obrigado.

*“Não é pelas coisas serem difíceis que não devemos ousar.
É por não ousarmos que elas se tornam difíceis”*

Sêneca

ÍNDICE

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Lista de Abreviaturas	8
1.Introdução	9
2.Análise SWOT	10
2.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>).....	10
2.1.1. Localização da Farmácia.....	10
2.1.2. Instalações Funcionais e Modernas	10
2.1.3. Inovação na Prestação de Serviços de Saúde Pública	12
2.1.4. Estrutura do Plano do Estágio	12
2.1.5. Dermofarmácia e Cosmética.....	15
2.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)	15
2.2.1. Interrupção do Estágio por Declaração do Estado de Emergência.....	15
2.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	16
2.3.1. Formações Internas	16
2.3.2. Acompanhamento Farmacoterapêutico.....	16
2.3.3. Dispensa de Medicamentos Hospitalares	16
2.3.4. Venda de Medicamentos de Uso Veterinário.....	17
2.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	17
2.4.1. Medicamentos Esgotados e Alterações de Preços dos MSRM.....	17
2.4.2. Venda de MNSRM fora das Farmácias.....	18
2.4.3. Solicitação Abusiva de MSRM.....	19
2.4.4. Estatuto do Medicamento Genérico.....	19
2.4.5. Pandemia COVID-19.....	20
3.Conclusão	21
4.Bibliografia	22
5.Anexo - Ficha de Preparação do Medicamento Manipulado	24

PARTE II - MRNA: NOVA TERAPIA NO TRATAMENTO DO CANCRO

ABSTRACT	32
RESUMO	33
Lista de Abreviaturas	34
1.Introdução	35
2.Estrutura Biológica do RNA	37
3.Entrega in vivo de mRNA	39
3.1. Administração ex vivo de mRNA em Células Dendríticas.....	42
3.2. Injeção de mRNA Livre <i>in vivo</i>	42
3.3. Métodos Físicos de Entrega <i>in vivo</i>	43
3.4. Protamina	43

3.5.	Lípidos Catiônicos e Veículos Poliméricos	43
3.6.	Vesículas Extracelulares	45
4.	Aplicações Terapêuticas do mRNA	47
4.1.	Vacinas Antitumorais	50
4.1.1.	Vacinas de mRNA para o Cancro à base de Células Dendríticas.....	53
4.1.2.	Imuno-oncologia Intratumoral	56
4.1.3.	Vacinas de mRNA Personalizadas para o Cancro	60
4.1.4.	Vacinas de mRNA que Codificam Anticorpos	62
5.	Dinâmica In Vivo	65
5.1.	Estabilidade	65
5.2.	Entrega Intracelular	66
5.3.	Toxicidade.....	68
6.	Perspetivas Futuras e Notas Conclusivas	69
7.	Referências.....	72

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA



Orientadora: Dra. Maria Isabel Belchior

Lista de Abreviaturas

DGAE – Agência Portuguesa do Ambiente e Direção Geral das Atividades Económicas

DGS – Direção Geral de Saúde

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FS – Farmácia Silcar

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia.

PVP – Preço de Venda ao Público

SPMS – Serviços Partilhados do Ministério da Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Universidade de Coimbra requer a realização de um Estágio Curricular em Farmácia Comunitária. Esta última etapa antes da conclusão do curso permite que os estudantes tenham o primeiro contacto com o mercado de trabalho e desenvolvam diversas aptidões técnicas e organizacionais essenciais para se tornarem bons profissionais de saúde.

A farmácia comunitária representa um dos setores da saúde e é nela que desempenham funções a maioria dos farmacêuticos. Estes profissionais, por serem, em muitos casos, o primeiro contacto da população com um elemento ativo do sistema de saúde, têm um papel fundamental na Saúde das populações, não só por possuírem o conhecimento profundo do medicamento como também por, de uma forma apurada e individualmente adaptada a cada utente, contribuírem para uma adequada adesão aos tratamentos prescritos.

As farmácias são, em Portugal, serviços assistenciais privados e autónomos, o que obriga os farmacêuticos a desempenhar igualmente funções de gestão. É, por isso, essencial que estes profissionais estejam na posse de conhecimentos básicos nesta área (gestão de stocks, de encomendas, de vendas...). Atualmente de forma menos frequente, ainda que fulcral, é único e fundamental o seu papel na execução de medicamentos manipulados. Assim, ainda que umas funções estejam mais presentes que outras na sua atividade profissional, todas elas são essenciais para o sucesso funcional de uma farmácia.

Em suma, um estágio em farmácia comunitária é considerado indispensável para a formação de um futuro farmacêutico. Não só permite consolidar e pôr em prática conhecimentos adquiridos ao longo do curso de ciências farmacêuticas, mas também possibilita experienciar “*in locu*” a própria profissão. O presente relatório descreve o trabalho desenvolvido durante o meu estágio na Farmácia Silcar (FS) sob a tutela da respetiva Farmacêutica Diretora Técnica Maria Isabel Belchior.

Em consequência do plano de contingência contra a infeção por COVID-19, vi-me na obrigação de interromper temporariamente o meu estágio em farmácia comunitária. Em todo o território português as farmácias agiram em conformidade com a circular nominativa¹ para as farmácias no âmbito da pandemia COVID-19 relativamente à direção técnica, fornecimento de medicamentos, dispensa ao domicílio e encerramento temporário. Este novo normativo articulado pela Ordem dos Farmacêuticos, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED) e as associações de farmácias pretende assegurar a cobertura farmacêutica em todo o território nacional, zelando pela segurança quer dos utentes como dos próprios profissionais de saúde. São várias as medidas excecionais e procedimentos de

segurança apresentados nesta circular com vista a minimizar o risco de propagação do novo coronavírus. Mais uma vez não foi tido em consideração o nível de exposição dos farmacêuticos apesar das farmácias serem, muitas vezes, o local de primeiro contacto do doente com um profissional de saúde.

2. Análise SWOT

Tal como consta nas “Normas Orientadoras de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas”, o relatório de estágio encontra-se na forma de análise SWOT, do inglês: *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*². Apesar de ter sido desenvolvida na década de 60 num contexto empresarial³, trata-se de uma técnica de avaliação estratégica que me permitiu realizar uma avaliação crítica da minha experiência profissional enquanto estagiária integrada na equipa da FS, através de uma análise profunda e fundamentada tanto do ponto de vista interno, maximizando os pontos fortes e contemplando, sem nunca negligenciar, os pontos fracos, como do ponto de vista externo, realçando as oportunidades concebidas e as ameaças sentidas no decorrer desta etapa.

2.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

2.1.1. Localização da Farmácia

A FS tem uma excelente localização, visto encontrar-se situada no centro da cidade de Coimbra, próximo de uma zona residencial, escolas, supermercados e outros locais de interesse público. Dada a sua localização estratégica, é uma farmácia visitada por pessoas de diferentes faixas etárias, residentes e de passagem, o que tornou o meu contacto com o público bastante mais enriquecedor e diversificado. Estando esta localizada num ponto de passagem, tive um contacto com diferentes casos e experiências que, sem dúvida, me ajudaram a ter uma perceção diversificada de como lidar com cada atendimento e aprender a estar mais atenta a cada detalhe.

2.1.2. Instalações Funcionais e Modernas

A FS abriu portas na sua nova localização na Rua do Brasil em 2011 colocando à disponibilidade dos seus utentes um espaço moderno de elevada qualidade e funcionalidade.

A farmácia possui apenas um piso com uma sala de atendimento, ampla, de forma a favorecer a livre circulação de utentes e colaboradores, sendo bastante iluminada, quer por luz natural como artificial, o que aumenta a atratividade do espaço. Nesta divisão estão

disponíveis bancos que permitem, se necessária, uma espera mais confortável a utentes mais idosos e/ou de mobilidade reduzida assim como apoio no aconselhamento de material ortopédico e sapataria; um ecrã central para visualização de imagens, notícias farmacêuticas e campanhas de sensibilização relevantes; uma mesa de diversão infantil garantindo o entretenimento das crianças enquanto os familiares estão a ser tranquilamente atendidos; e, finalmente, 4 balcões de atendimento individualizados. A zona de atendimento está preparada para acolher um sistema de atribuição de senhas, no entanto, durante o meu estágio, este não esteve funcional. Numa abordagem mais atenta e tirando partido dos pontos de passagem mais comuns dentro da farmácia, é visível a utilização de material de *merchandising*, expositores e *testers* de forma a dar a conhecer os produtos e as promoções em vigor. Disponibiliza, também, um conjunto vasto de lineares com produtos de dermocosmética separados por marca e uma zona de sapataria ortopédica. Atrás dos balcões de atendimento, é evidente uma grande área de exposição de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), inacessível ao público, organizada por patologia sendo esta alterada consoante a época do ano e as patologias mais comuns na sociedade. Na parte inferior destes lineares, existem ainda algumas gavetas com outros MNSRM, ordenados por ordem alfabética e forma farmacêutica. Mais distante da entrada, encontramos 3 gabinetes (um maior e dois mais pequenos). Nos dois gabinetes mais pequenos, ditos gabinetes de apoio, são realizadas as medições da tensão arterial e prestado o serviço de troca de seringas. Para além disso, aí também encontramos alguma literatura científica disponível para consulta pelos colaboradores. No gabinete maior, dotado de uma casa de banho (destinada aos utentes), são realizadas as medições de parâmetros bioquímicos tais como a glicémia, colesterol e triglicéridos; aqui também se procede à administração de injetáveis. Este mesmo gabinete, é disponibilizado, para a realização tanto de consultas de podologia como de aconselhamento nutricional. Todos estes espaços estão igualmente disponíveis para reuniões com delegados de informação médica e formações internas.

Sucedem-se, a zona de armazenamento de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) com gavetas extensíveis; a zona de receção de encomendas; o gabinete do diretor técnico; o laboratório destinado à preparação de medicamentos manipulados; uma parede extensa com estantes de arrumação destinadas ao armazenamento de medicamentos e outros produtos, organizados por ordem alfabética; a zona comum, onde se encontra exposta a tabela de divisão de tarefas, horários e objetivos de todos os membros da equipa, com o objetivo de agilizar e gerir, de forma mais eficiente, o trabalho e responsabilidades de cada membro da equipa; e, por fim, uma casa de banho destinada aos colaboradores da FS. É importante notar que a organização nos espaços de armazenamento é cuidadosamente regida por tipo de

produto (medicamento genérico, medicamento de marca, produtos de higiene oral, produtos de dermocosmética, dispositivos médicos, sapatos, entre outros) bem como, por prazo de validade, vigorando constantemente a máxima “*first in/expired, first out*”, isto é, os produtos com o prazo de validade mais curto serão os primeiros a sair. A implementação desta regra permite uma gestão de *stocks* mais eficiente e evita facilmente quebras desnecessárias.

2.1.3. Inovação na Prestação de Serviços de Saúde Pública

No que diz respeito aos serviços de saúde pública em vigor, realço o programa de troca de seringas, a ValorMed e a reciclagem de radiografias.

A FS foi das primeiras farmácias no distrito de Coimbra a fazer parte do programa de troca de seringas, iniciado em 1993 sob a alçada da Direção Geral de Saúde (DGS) e do programa Nacional para a Infecção HIV/SIDA em parceria com os Serviços Partilhados do Ministério da Saúde (SPMS). Este programa foi criado com o objetivo último de reduzir o número de infetados por doenças infecciosas (como HIV e Hepatites B e C) no grupo de pessoas que usam drogas injetáveis⁴. Num espaço reservado para este propósito, são cedidos gratuitamente *kits* novos e recolhidas seringas usadas.

A ValorMed, uma sociedade sem fins lucrativos criada em 1999 sob a tutela da Agência Portuguesa do Ambiente e Direção Geral das Atividades Económicas (DGAE), foi implementada na FS tendo em vista a preservação do ambiente e da saúde pública permitindo a recolha de embalagens vazias e medicamentos fora do prazo de validade, para posterior tratamento dos mesmos⁵.

Por fim, realço o Programa de Reciclagem de Radiografias, dinamizada pela Assistência Médica Internacional (AMI) em colaboração com as Farmácias Portuguesas. A farmácia disponibiliza-se para a recolha de radiografias antigas ou sem valor diagnóstico e possibilita o seu tratamento posterior pela instituição permitindo tanto uma melhor gestão de resíduos como a recuperação dos sais de prata contidos nas mesmas. De facto, a venda desta matéria prima tornou-se uma fonte de receitas muito importante para o trabalho social da AMI em território nacional⁶.

2.1.4. Estrutura do Plano do Estágio

A FS destaca-se pelo facto de acompanhar os seus estagiários ao longo de todas as funções e valências de um farmacêutico na farmácia comunitária, acabando por me fornecer uma base informativa altamente completa. Considero que todo o plano de estágio estava bem

organizado e delineado por forma a que garantisse a minha passagem por todas as áreas fundamentais para uma gestão e funcionamento de uma farmácia comunitária.

Assim sendo, o meu estágio foi constituído pelas seguintes etapas:

- Avaliação e Discussão de Casos Práticos onde me foram apresentadas diferentes situações comuns onde o farmacêutico é capaz de acompanhar e aconselhar o(s) interveniente(s) tanto com medidas não farmacológicas como recorrendo a MNSRM ou MNSRM de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF).
- Enquadramento Legal e Noções Básicas de Contabilidade em Farmácia Comunitária mostraram-se bastante úteis na medida em que me permitiram ver a farmácia como empresa, enquadrada numa estrutura legislativa com as suas particularidades. Efetivamente, esta é uma área bastante importante na formação de um farmacêutico e que, a meu ver, deveria ser parte integrante da nossa formação a nível universitário.
- Gestão de Encomendas e Armazenamento de Produtos, onde se rececionava, conferia e criava encomendas sob a supervisão do farmacêutico responsável. Somente após a validação e atualização do prazo de validade, confirmação dos preços de venda ao público (PVPs), confirmação do valor total da encomenda e da verificação do número de embalagens no sistema é que se procedia ao respetivo armazenamento dos produtos rececionados, dando especial atenção aos medicamentos com condições especiais de conservação que, por forma a manter a sua qualidade e estabilidade, eram logo rececionados e armazenados. Para além disso, procedia-se de imediato à reclamação e/ou devolução quando se verificava alguma irregularidade como produtos danificados, produtos faturados incorretamente, produtos faturados e não enviados como produtos não faturados e enviados.
- Gestão Comercial e Contabilidade mostrou-se extremamente importante para a gerência de uma farmácia de qualidade. De facto, a gestão dos stocks máximos e mínimos dos diferentes produtos de acordo com a procura, assim como o controlo dos respetivos prazos de validade, mostraram-se tarefas fundamentais permitindo evitar perda de vendas por falta de produtos ou perda de produtos por rotura de stock. Mostrou-se evidente a necessidade da farmácia de adaptar a escolha de produtos de acordo com a estação do ano e em função dos desejos da população. Para além disso, a escolha de distribuidores e o estabelecimento de contactos na procura das condições e descontos mais vantajosos para a farmácia, exige, efetivamente, uma busca incessante pelas melhores oportunidades revelando-se, mais uma vez, como desafiantes as diferentes apetências do farmacêutico comunitário.

- Na Preparação de Medicamentos tive a oportunidade de contactar e reconstituir algumas preparações extemporâneas de antibióticos orais que são comercializados sob a forma de pó liofilizado (devido à sua instabilidade em solução) que, aquando da sua administração, necessitam de ser transformados numa suspensão com a simples adição de água purificada. Tive ainda a oportunidade de assistir e auxiliar na preparação de um medicamento manipulado ainda que a sua procura tenha diminuído consideravelmente nos últimos anos resultado de uma indústria farmacêutica cada vez mais evoluída. Este tipo de medicação justifica-se em casos específicos de personalização da terapêutica, de preenchimento de lacunas terapêuticas ou ainda quando a forma farmacêutica não é comercializada. Ainda que a FS não possua muita procura deste tipo de medicamentos por parte dos seus utentes, fui capaz de por em prática os conhecimentos adquiridos em Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica na preparação de uma pomada de vaselina salicilada a 6%, com propriedades queratolíticas (uma vez que esta estava presente numa concentração superior a 2%) e 30g de Diprosone® 0,5mg/g (dipropionato de betametasona) creme, um corticosteroide tópico para alívio das manifestações inflamatórias e pruriginosas associadas a dermatoses sensíveis a corticosteroides, cuja ficha de preparação encontra-se no Anexo I⁷. Este preparado trata-se de uma Fórmula Magistral uma vez que foi preparado segundo uma prescrição médica para um doente em particular e, portanto, recai no farmacêutico a responsabilidade da correta interpretação da receita, seleção de matérias-primas, manipulação com vista a garantir a qualidade do produto final, acondicionamento, rotulagem e aconselhamento do doente no momento da sua dispensa (posologia/modo de utilização, condições de conservação e prazo de validade)⁸.
- Atendimento ao Público, talvez a função mais desafiante de todo o estágio. Começou calmamente, com um carácter meramente observacional para que me fosse ambientando a toda a dinâmica e imprevisibilidade do ato de dispensa ao público. Posteriormente, comecei a realizar alguns atendimentos acompanhada, com o intuito de me começar a familiarizar tanto com o contacto direto com o utente assim como com o funcionamento do Sifarma 2000® e de todas as suas funcionalidades. Nesta etapa mais tardia do meu estágio, os meus erros foram reconhecidos e gradualmente ultrapassados. Gradualmente fui ganhando alguma confiança e sendo capaz de integrar os meus conhecimentos de Farmacologia, Indicação Farmacêutica e Farmácia Clínica num aconselhamento cada vez mais completo a cada dia que passava. Neste enquadramento, com a interação com o público foi possível desenvolver algumas

competências como o espírito crítico, a confiança, destreza informática e adequação da linguagem científica de acordo com as diferentes situações com que me deparava. Como irei referir adiante, o rendimento do meu estágio e a estruturação do mesmo ficou, no entanto, comprometida devido à interrupção do mesmo durante o estado de emergência nacional derivado da pandemia pela COVID-19 durante grande parte dos meses de março e abril de 2020.

2.1.5. Dermofarmácia e Cosmética

As doenças de pele são muito frequentes na população e motivo de procura de ajuda. As farmácias em conjunto com os dermatologistas preocupam-se em fornecer produtos e informação de qualidade a estes doentes. Algumas doenças são auto-resolutivas, outras apresentam apenas um defeito estético e podem ser corrigidas por técnicas de dermocosmética e outras ainda são crónicas, como a psoríase, que apresentam um grande impacto na qualidade de vida e, mesmo que não tenham cura definitiva, o cuidado dermatológico permanente permite aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida do doente⁹. O papel do farmacêutico é aqui importante sendo capaz de intervir em todas estas dimensões dos cuidados de pele e seguir, em primeira mão, os efeitos destes produtos. Posto isto, considero que estar numa farmácia com uma equipa entendedora e experiente neste campo foi uma mais valia para o meu estágio uma vez que os conhecimentos adquiridos já que o contacto com este tipo de produtos, matérias primas, marcas e gamas, durante a minha formação na universidade, foi bastante limitado. Ao longo do meu estágio foi evidente o quanto a área da dermofarmácia e o aconselhamento farmacêutico nesta área é importante na manutenção da saúde tanto física como psicológica do utente.

2.2. Prontos Fracos (*Weaknesses*)

2.2.1. Interrupção do Estágio por Declaração do Estado de Emergência

Em consequência da declaração do estado de emergência nacional devido à COVID-19 no dia 18 de março de 2020, vi-me na obrigação de suspender o meu estágio na FS por tempo indeterminado. Com o desenvolver da situação, após aproximadamente dois meses e meio de interrupção, no dia 5 de maio reuniram-se as condições necessárias para a retoma dos estágios em farmácia comunitária pelos alunos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC).

Aquando da minha interrupção, a FS permaneceu aberta adaptando-se sempre às exigências da comunidade, tendo atuado na linha da frente na assistência direta à população

nas alturas mais críticas. Como consequência, no momento em que retomei o meu estágio na FS foi evidente o cansaço físico e psicológico de todos os elementos da equipa. Assim, a parte final da minha formação viu-se um tanto comprometida, uma vez que o meu tempo no atendimento ao público foi bastante limitado, influenciando a minha confiança no aconselhamento, agilidade no atendimento e destreza informática. Ainda que, após a retoma, tenha tido a oportunidade de fazer alguns atendimentos, a suspensão do estágio veio, de certo modo, restringir a minha experiência em farmácia comunitária.

2.3. Oportunidades (*Opportunities*)

2.3.1. Formações Internas

Uma vez que a formação técnico-científica é uma constante na prática da atividade farmacêutica, a FS deu-me a oportunidade de participar em diversas formações internas cedidas por delegados de informação médica pertencentes às diferentes indústrias farmacêuticas e laboratórios, por forma a apreender novos conhecimentos e consolidar outros já adquiridos. Na sua generalidade eram de curta duração, durante o período de funcionamento da farmácia e consistiam, essencialmente, na apresentação de produtos (MNSRM, dermofarmácia ou medicamentos veterinários), das respetivas indicações terapêuticas, vantagens, e estratégias de venda. Neste âmbito, tive a oportunidade de experienciar cerca de 4 formações internas, desde a área da dermocosmética à dos medicamentos veterinários, o que me permitiu adquirir conhecimentos essenciais para o aconselhamento e atendimento ao público.

2.3.2. Acompanhamento Farmacoterapêutico

Por regra, a FS tem afluência de um elevado número de utentes fidelizados, maioritariamente residentes, de todas as idades, incluindo estudantes e trabalhadores das redondezas. Desta forma, o farmacêutico consegue ter um papel ativo no seguimento farmacoterapêutico sendo, para tal, bastante útil a ferramenta “Histórico” presente na ficha de utente do Sifarma 2000® que me possibilitou consultar a medicação habitual de cada utente em particular, garantindo um aconselhamento otimizado, fidedigno e informado.

2.3.3. Dispensa de Medicamentos Hospitalares

Perante o contexto da pandemia por COVID-19, por forma a diminuir a afluência de doentes do ambulatório hospitalar aos hospitais centrais (locais mais propícios de contágio), foi criado um circuito secundário de entrega e dispensa de medicamentos hospitalares nas

farmácias comunitárias. Posto isto, no passado dia 7 de abril de 2020, o Ministério da Saúde publicou o Despacho nº 4270-C/2020¹⁰ que veio autorizar o fornecimento de medicamentos dispensados pelos serviços farmacêuticos hospitalares aos doentes em regime de ambulatório, a pedido do utente, através das farmácias comunitárias e da entrega ao domicílio. Na sequência deste despacho, no mesmo dia, o INFARMED emitiu a Circular Normativa nº 005/CD/550.20.001 com “orientações sobre acesso de proximidade a medicamentos dispensados em regime ambulatório de farmácia hospitalar no atual contexto de pandemia por covid-19”¹¹. Esta medida de “caráter excecional e temporário” vigorou somente durante o estado de emergência. Durante este período foi também permitida a dispensa de quantidades adicionais de medicamentos, tornando mais flexíveis algumas obrigações dos serviços farmacêuticos hospitalares¹². Neste contexto, foi-me possível contactar com novos medicamentos e guias terapêuticos aos quais, sem esta medida, não teria tido acesso.

2.3.4. Venda de Medicamentos de Uso Veterinário

A partir de 2007, com o programa piloto de venda de medicamentos de uso veterinário nas farmácias, tornou-se possível a venda de produtos veterinários aproveitando a extensa rede de farmácias por forma a alargar a oferta destes produtos à generalidade do território nacional, movida pela convicção de que as farmácias estão nas melhores condições para regularizar a distribuição e comercialização dos medicamentos e produtos veterinários, prestando um serviço seguro e de qualidade. É notório que a venda destes produtos nas farmácias veio trazer a possibilidade de promover uma utilização correta e racional deste tipo de medicamentos, uma vez de venda livre, alicerçada com a abertura de um nicho de mercado, levando ao aumento de lucros para a farmácia. Neste sentido, por forma a garantir um aconselhamento correto sobre a forma como estes medicamentos devem ser administrados sem riscos quer para os animais como para os próprios utentes, a formação constante destes profissionais de saúde junto de clínicos e delegados de informação médica é imperativa.

2.4. Ameaças (*Threats*)

2.4.1. Medicamentos Esgotados e Alterações de Preços dos MSRM

Estive perante situações em que me deparei com o descontentamento e frustração dos utentes perante a impossibilidade de lhes serem dispensados os medicamentos prescritos e já de toma habitual ou mesmo de medicamentos sem alternativa terapêutica, pelo facto de estes se encontrarem indisponíveis nos armazenistas e sem previsão de chegada à farmácia. A maior parte das vezes, não é a imagem do laboratório que produz o medicamento, nem do

distribuidor, que fica denegrida, mas sim a do farmacêutico e da farmácia que não consegue disponibilizar o medicamento em causa.

Realço o exemplo do Victan® - embalagem de 20 e 60 comprimidos revestidos contendo Loflazepato de Etilo como princípio ativo - indicado para perturbações da ansiedade e sintomas ansiosos. Apesar de não ser considerado um medicamento de uso crónico, a falta no stock das farmácias a nível nacional originou uma grande exaltação e preocupação tanto nos doentes como de toda a equipa técnica. De facto, no dia 21/07/2020, o INFARMED emitiu uma circular informativa¹³ relativa à rutura do fornecimento deste medicamento às farmácias pela incapacidade temporária da empresa Sanofi Produtos Farmacêuticos Lda. (detentora da única autorização de introdução do mercado deste fármaco) de abastecer o mercado.

Durante o meu estágio também surgiram algumas situações relacionadas com as constantes alterações dos preços dos MSRM, especialmente quando essa alteração se traduzia no seu aumento. Na generalidade destas situações, a interação utente-farmacêutico ficava comprometida uma vez que os utentes se sentiam indignados, culpando a farmácia por esse aumento. Nestas circunstâncias, tentámos ao máximo explicar e esclarecer o doente de que o preço dos medicamentos é estabelecido pelo laboratório/indústria farmacêutica que o produz, não estando dependente da política de vendas da FS. Por outro lado, a alteração de preços dos medicamentos também se mostrou um obstáculo no momento de regularização de vendas de medicamentos uma vez que, utilizando uma receita médica em formato eletrónico, se tornava impossível a regularização da venda caso estes sofressem uma alteração do seu PVP entre o momento da chamada da venda suspensa (dispensa do medicamento) e a respetiva regularização.

2.4.2. Venda de MNSRM fora das Farmácias

Perante o Decreto-Lei nº 134/2005 de 16 de Agosto, foi legalizada a venda de MNSRM fora das farmácias, uma vez que foram reconhecidos, pelo governo, benefícios dados aos consumidores quer em termos de acessibilidade, uma vez que aumentariam o número de postos de venda, como em termos de preço¹⁴. É bastante visível a crescente dominância destes estabelecimentos, essencialmente nas grandes superfícies, ameaçando a profissão farmacêutica não só por motivos económicos, mas também pela banalização do estatuto do medicamento. Para além do forte impacto na viabilidade económica da farmácia, uma vez que as grandes superfícies efetuam grandes volumes de vendas permitindo-lhes a prática de PVPs inferiores, verifica-se ainda um apelo desmedido e imprudente à automedicação, muitas vezes irresponsável, sem que seja efetuado o devido aconselhamento e acompanhamento

farmacoterapêutico ao utente para que o medicamento seja tomado com a maior pertinência e segurança. Tudo isto se deve ao simples facto da rentabilidade destes postos de venda de MNSRM fora das farmácias ser medida meramente pelo volume de vendas e não pelo viabilidade terapêutica e qualidade do aconselhamento.

2.4.3. Solicitação Abusiva de MSRM

Durante todo o meu estágio foi evidente uma solicitação exagerada de MSRM sem apresentação da respetiva prescrição médica, colocando o farmacêutico numa posição complicada perante o utente. As justificações eram várias, desde o facto do(s) medicamento(s) em causa não serem comparticipados pelo estado até o valor da consulta médica necessária para a renovação da medicação ser superior ao valor da comparticipação não se justificando, portanto, a deslocação até ao centro de saúde ou centro hospitalar para a obtenção da mesma. Adicionalmente, por causa do Sars-CoV-2, os portugueses deixaram de recorrer aos estabelecimentos de saúde por receio de contacto e contração da doença, o que também veio contribuir para a exacerbação desta problemática. Esta forma de pensar é assustadoramente generalizada na população mais velha tornando-se uma ameaça direta à responsabilidade do farmacêutico como profissional de saúde que sempre procura zelar pela segurança e saúde da sua comunidade. Este comportamento não só promove uma desvalorização do medicamento, mas também fomenta a ideia errada de que a prescrição médica existe simplesmente por forma a diminuir os custos em saúde.

Desta forma, considero importante a sensibilização da população no sentido de fomentar respeito pela prescrição médica e realçar a sua importância na manutenção de uma terapêutica segura, acompanhada e rentável.

2.4.4. Estatuto do Medicamento Genérico

Segundo o estipulado pelo Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de agosto, um medicamento genérico tem “a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica, dosagem e a indicação terapêutica que o medicamento original, de marca, que serviu de referência”¹⁵. Estes medicamentos, apesar de demonstrarem bioequivalência através de estudos de biodisponibilidade, traduzida na mesma eficácia e segurança que os medicamentos de marca correspondentes, muitos são os utentes reticentes quanto à sua dispensa. Trata-se de um tema bastante importante e delicado que exige uma atenção redobrada pela comunidade farmacêutica no sentido de informar e desmistificar falsos receios de forma a evitar que os utentes não iniciem ou continuem o tratamento por indisponibilidade

do medicamento de marca havendo a opção de uma marca genérica igualmente eficaz e confiável, muitas vezes economicamente mais acessível.

2.4.5. Pandemia COVID-19

Em consequência do surto pandémico pela Covid-19 e posterior declaração de estado de emergência nacional¹⁶, o meu estágio foi interrompido no dia 13 de março.

Desde o início do mês de fevereiro de 2020 as farmácias viveram numa constante azáfama. A declaração dos primeiros casos em Portugal veio trazer um ambiente de incerteza, receio e desconfiança no outro e no futuro entre a população. Durante este mês intenso ainda me encontrava em estágio na FS. Na semana anterior à data de declaração do Estado de Emergência Nacional, houve uma solicitação desmedida de máscaras de proteção e álcool gel, deixando o *stock* comprometido. Nesta fase, houve, também, um grande afluxo de pessoas à farmácia a solicitar, principalmente, MNSRM para sintomatologia de gripe e constipação, assim como, suplementos alimentares com indicação de reforço imunitário essencialmente à base de vitamina C, D, zinco e selénio. Em contrapartida, verifiquei utentes indiferentes e despreocupados com a situação, não seguindo as regras de higiene e etiqueta respiratória, nem respeitando as recomendações de distanciamento e isolamento social.

O abastecimento de medicamentos à farmácia também foi um problema grave que tomou de surpresa a FS, uma vez que, em muitas encomendas estavam associadas faltas de produtos, medicamentos esgotados e erros de faturação, para além da diminuição repentina do número de entregas diárias por parte de alguns fornecedores. Como seria espectável, esta situação criou uma enorme preocupação e inquietação em toda a equipa levando a uma alteração repentina e inevitável de toda a dinâmica de gestão e trabalho na FS.

Gostaria de ressaltar que, desde o início, as farmácias tiveram um papel trivial na gestão do clima de insegurança, ansiedade e preocupação da população perante esta doença infecciosa que tomou de surpresa todo o mundo. De um ponto de vista pessoal, encaro, o surto pandémico pela Covid-19, como uma ameaça para o meu estágio curricular uma vez que veio afetar todo o seu desenvolvimento numa fase importante em que já me encontrava a aplicar muitos dos conhecimentos adquiridos durante os primeiros meses de estágio. Não obstante, estou consciente que a decisão foi tomada mediante a existência de riscos e ameaças à segurança e saúde da população.

3. Conclusão

Dado por terminado o meu estágio curricular na FS, reconheço que estes seis meses resultaram na preparação para um serviço de excelência em conjunto com uma aprendizagem profunda sobre o papel do farmacêutico como profissional de saúde multivalente, que me permitiram encarar o meu futuro profissional com otimismo e confiança. Considero que todas as dificuldades, receios e incertezas ao longo do meu percurso me ajudaram a crescer como profissional de saúde competente e responsável.

Sem dúvida que o aumento das funções e dos serviços disponibilizados pelas farmácias à sociedade são exemplos da mudança de atitude dos farmacêuticos e da própria sociedade perante estes profissionais de saúde indispensáveis à manutenção da saúde comunitária.

Posto isto, considero um farmacêutico competente aquele que será um eterno estudante, um profissional de saúde preocupado, capaz de ouvir e satisfazer, com o maior rigor científico e plenitude, as necessidades do utente e da comunidade. Sem dúvida que o estágio curricular em Farmácia Comunitária prepara os alunos do MICF para o futuro exercício da profissão farmacêutica neste setor e, como tal, agradeço a equipa da FS por todo o apoio, paciência e conhecimento valioso que me transmitiram, assim como à FFUC por esta oportunidade, defendendo a continuação da sua inclusão na formação dos alunos nos anos vindouros.

4. Bibliografia

1. INFARMED, I.P. CIRCULAR NORMATIVA N° 001/CD/100.20.200. – **Orientações técnicas para farmácias no âmbito da pandemia COVID-19.** [Consultado a 20 de junho 2020]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal_content/56/15786/3578463
2. FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA. Normas Orientadoras do Estágio Curricular. (2020).
3. HEFLO – **Entenda definitivamente o que é análise SWOT.** [Consultado a 24 de junho 2020]. Disponível em: <https://www.heflo.com/pt-br/swot/o-que-e-analise-swot/>
4. SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE – **Programa de Troca de Seringas.** [Consultado a 27 de junho 2020]. Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2019/11/11/programa-de-troca-de-seringas-2/>
5. VALORMED – **Quem somos.** [Consultado a 27 de junho 2020]. Disponível em: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
6. RECICLAGEM DE RADIOGRAFIAS – **Reciclagem de Radiografias com mais de 5 anos ou sem valor de diagnóstico.** [Consultado a 27 de junho 2020]. Disponível em: <https://ami.org.pt/missao/reciclagem-de-radiografias/>
7. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento Diprosone[®] 0,5 mg/g, Creme.** [Consultado a 27 de junho 2020]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
8. INFARMED, I.P. – **Medicamentos manipulados.** [Consultado a 27 de junho 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>
9. SOCIEDADE PORTUGUESA DE DERMATOLOGIA E VENEREOLOGIA – **Dermatologista – Doenças da pele** [Consultado a 27 de junho 2020]. Disponível em: https://www.spdv.pt/_doencas_de_pele_2
10. TEMIDO DE ALMEIDA SIMÕES, M. – Despacho n° 4270-C/2020. Saúde. Gabinete da Ministra. Diário da República. 2ª Série. Parte C. n°69 de 7 de abril de 2020. [Consultado a 20 de junho 2020]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/131246680>
11. INFARMED, I.P. – **Orientações sobre acesso de proximidade a medicamentos dispensados em regime ambulatorio de farmácia hospitalar no atual contexto de pandemia por COVID-19.** [Consultado a 28 de junho 2020]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal_content/56/15786/3624277

12. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Notícias – Saúde regula dispensa de medicamentos hospitalares nas farmácias comunitárias.** [Consultado a 28 de junho 2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/saude-regula-dispensa-de-medicamentos-hospitalares-nas-farmacias-comunitarias/>
13. INFARMED, I.P. – CIRCULAR INFORMATIVA N° 134/CD/100.20.200 – **Indisponibilidade do Medicamento Victan 2mg.** [Consultado a 22 de julho 2020]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/3464134/Indisponibilidade+do+Medicamento+Victan+2mg/a02a6fa4-d120-4ac8-993c-ec4daded1744>
14. Decreto-Lei n° 134/2005 de 16 de agosto de 2005 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n° 156 de 16 de agosto de 2005.
15. Decreto-Lei n° 176/2006 de 30 de agosto de 2006 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n° 167 de 30 de agosto de 2006.
16. Decreto do Presidente da República n° 14-A/2020 de 18 de março de 2020 da Presidência da República, Diário da República n°55/2020, 1ª Série de 18 de março de 2020.

5. Anexo – Ficha de Preparação do Medicamento Manipulado

Receita Médica Nº [REDACTED]





Utente: [REDACTED] [REDACTED] MM
 Telefone: [REDACTED] R.C.: [REDACTED]
 Entidade responsável: SNS
 Nº. de Beneficiário: [REDACTED]

[REDACTED] Especialidade: [REDACTED]
 [REDACTED] Telefone: [REDACTED]

R	DCI / Nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia	Nº	Extensão	Identificação Ótica
1	FSA, vaselina salicilada 6%, betametasona 0.5 mg-creme 30 g Manipulado Posologia: aplicar	1	Uma	
2				
3				
4				

Validade: 30 dias
 Data: 2020-05-29

[REDACTED]
(assinatura do Médico prescriptor)

Processado por computador - Medic@One, versão 8.1 - Medic@One, Min. Saúdes, Comput@o, S.A.


 Direcção Técnica Maria Isabel Belchior
 Rua do Brasil 518, 3070-775 Coimbra
 T 239 406 990

LOTE 1502/20 Preço 28,15 €
 Doente [REDACTED]
 Diprosone @ 0,5 mg / g Creme - 30 g
 Acido salicilico - 6g
 Vaselina qsp 100 g
 USO EXTERNO
 Data Preparação 26/06/20. Prazo utilização 26/09/20

FARMACIASILCO
 Maria Isabel Belchior Unipessoal Lda
 NIF 513 384 863
 Rua do Brasil, 518, 3030-775 COIMBRA
 Tel 239 495 990 Fax 239 406 990
 (Crimbo da Farmácia)

Ficha de Preparação

Medicamento: Diprosone[®] + Vaselina salicilada a 6%.

Teor em substância(s) activa(s): 100 g (ml ou unidades) contém 6g 15 mg g (ml) de Ácido salicílico + Diprosone

Forma farmacêutica: Semi-sólida Data de preparação: 26/6/2020

Número do lote: N 02/20 Quantidade a preparar: 100 g

Matérias-primas	Lote nº	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100 g (ou ml, ou unidades)	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do Operador e data	Rubrica do Supervisor e data
Ácido salicílico	RAS812100	Labelum	F.P.	6 g	6 g	6 g	<i>[assinatura]</i>	
Diprosone [®]	5023240	MSD	—	30 g	30 g	30	<i>[assinatura]</i>	
Vaselina sólida	19020065	Alvita	F.P.	64 g	64 g	64 g	<i>[assinatura]</i>	

Preparação	Rubrica do Operador
1. Limpar a placa de espatulagem com álcool a 70°.	<i>[assinatura]</i>
2. Pesar as matérias-primas	<i>[assinatura]</i>
3. Inserir, por espatulagem, o ác. salicílico na vaselina	<i>[assinatura]</i>
4. Inserir, por espatulagem, o Diprosone no preparado anterior	<i>[assinatura]</i>
5. Espatular até à obtenção de uma pasta com aspeto homogéneo	<i>[assinatura]</i>
6. Acondicionar em recipiente adequado	<i>[assinatura]</i>

Rubrica do Director Técnico: *[assinatura]* Data: _____

7. limpar a placa de espátula e o restante material	AD
8.	
9.	
10.	
11.	
12.	
13.	
14.	
15.	
16.	

Aparelhagem usada:
 Balança, placa de espátula, espátula, vidro de relógio

Embalagem

Tipo de embalagem: Unguentar

Capacidade do recipiente: 100/140 ml

Material de embalagem	Nº do lote	Origem
Propileno	5AAAAAAAAS2G	Gaka

Operador: AD

Assinatura do Diretor Técnico: Belini Data: _____

Prazo de utilização e Condições de conservação

<p>Condições de conservação:</p> <p>Conservar ao abrigo da luz e calor, em recipiente bem fechado.</p>	Operador: <i>[assinatura]</i>
<p>Prazo de utilização:</p> <p>3 meses</p>	Operador: <i>[assinatura]</i>

Rotulagem

1. Proceder à elaboração do rótulo de acordo com o modelo descrito em seguida.
2. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia, rubricada e datada, do rótulo da embalagem dispensada.

Modelo de rótulo

Identificação da Farmácia Identificação do Director-Técnico Endereço e telefone da Farmácia	Identificação do Médico prescritor Identificação do Doente
DENOMINAÇÃO DO MEDICAMENTO	
Teor em substância(s) activa(s) Quantidade dispensada Referência a matérias-primas cujo conhecimento seja eventualmente necessário para a utilização conveniente do medicamento Posologia Via de administração	Data da preparação Prazo de utilização Condições de conservação Nº do lote Manter fora do alcance das crianças Advertências (precauções de manuseamento, etc.) Uso externo (caso se aplique) (em fundo vermelho)
Operador: <i>[assinatura]</i>	

Verificação

Ensaio	Especificação	Resultado	Rubrica do Operador
COX	bramea	conforme	<i>[assinatura]</i>

Rubrica do Director Técnico <i>[assinatura]</i>	Data
--	------

Ensaio	Especificação	Resultado	Rubrica do Operador
odor	inodoro	conforme	
aspecto	homogéneo	conforme	

Aprovado Rejeitado
 Supervisor _____

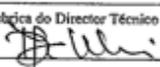
Nome e morada do doente

[REDACTED]

Nome do prescriptor

[REDACTED]

Anotações

Rubrica do Director Técnico 	Data
---	------

Cálculo do preço de venda

MATÉRIAS-PRIMAS:

matérias-primas	embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (a/IVA)		quantidade a usar	factor multiplicativo	valor de matéria-prima utilizada na preparação
	quantidade adquirida	preço de aquisição (a/IVA)	quantidade unitária	preço			
Diprosone®	1emb	2,47	1emb	2,47	x 1	x —	= 2,47
Nasalina sólida	100g	1,15	1g	0,0115	x 64	x 1,9	= 1,3984
Ac. salicílico	100g	1,34	1g	0,0134	x 6	x 2,2	= 0,1769
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
subtotal A							4,0453

HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:

	forma farmacéutica	quantidade	F(E)	factor multiplicativo	valor
valor referente à quantidade base	Semi-sólido	100g	5,03	x 3	= 15,09
valor adicional			x	x	=
subtotal B					15,09

MATERIAL DE EMBALAGEM:

materiais de embalagem	preço de aquisição (a/IVA)	quantidade	factor multiplicativo	valor
Umguatox 100/140	1,07	x 1	x1,2	= 1,284
		x	x1,2	=
		x	x1,2	=
		x	x1,2	= (1,284)
subtotal C				1,284

PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO: $(A + B + C) \times 1,3$ = 26,5451
 + IVA = 1,5927
D = 28,15

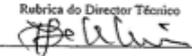
DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:

dispositivo	preço unitário	quantidade	valor
E			

PREÇO FINAL: D + E = 28,15 €

Operador: 

Supervisor: _____

Rubrica do Director Técnico	Data
	

Cálculo do preço de preparações-mãe e excipientes compostos destinados a serem armazenados

MATÉRIAS-PRIMAS:

matérias-primas	embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/IVA)		quantidade a usar	valor da matéria-prima utilizada na preparação
	quantidade adquirida	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade unitária	preço		
					X	=
					X	=
					X	=
					X	=
					X	=
					X	=
					X	=
					X	=

Preço de _____ g de _____ = _____

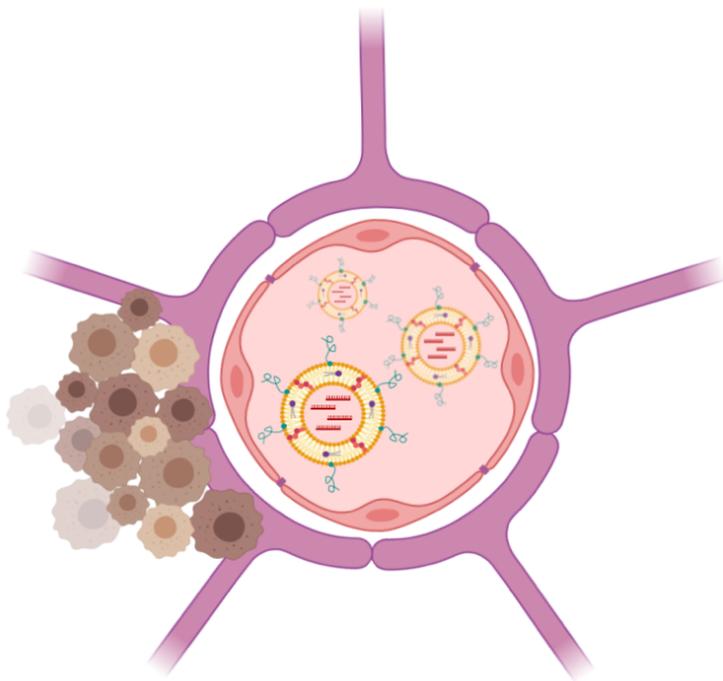
Preço de 1 g de _____ a considerar no cálculo do Preço de Venda ao Público dos medicamentos em que seja incluído este produto = _____

Operador _____ Supervisor _____

Rubrica do Director Técnico 	Data
---	------

PARTE II

MRNA: NOVA TERAPIA NO TRATAMENTO DO CANCRO



Orientador: Professor Doutor João Nuno Moreira

ABSTRACT

mRNA-based structures have biologically various functions ranging from the regulation of gene expression to the ability to trigger pro-inflammatory effects. These functions make it a versatile tool that may be applied in various scientific fields. In recent years, these molecules have arisen a special interest in the scientific community due to their potential in the development of innovative therapies *in vivo*, in particular in immunotherapy. Regarding solid tumours, their therapeutic application is extremely interesting once they make immunomodulation possible directly in the unregulated tumour microenvironment.

This work explores the particular characteristics of mRNA molecules and the different factors that can influence their effectiveness, especially in oncology. To that end, it is not only necessary to guarantee its safety as well as quality during its manufacturing process, but also is imperative to promote an effective delivery to the action site. The chosen delivery system must be able to overcome all biological barriers, avoid its extra and intracellular degradation and hence bring the therapeutic agent to the target in therapeutically relevant concentrations. In fact, efficient delivery remains a technical barrier to the application of mRNA molecules *in vivo*, only being somewhat overtaken by some non-viral drug delivery vehicles such as lipid nanoparticles, charge-altering releasable transporters and other few systems.

Keywords: mRNA, Immunotherapy, Immunomodulation, Tumours, Delivery Systems.

RESUMO

As estruturas bioquímicas à base de RNA mensageiro desempenham diferentes funções no nosso organismo, desde a regulação da expressão genética à capacidade de desencadear efeitos pró-inflamatórios. São, portanto, uma ferramenta útil, inovadora e versátil com uma vasta aplicação. Recentemente, a ciência reconheceu nestas moléculas um enorme interesse, devido ao potencial que apresentam no desenvolvimento de terapêuticas inovadoras *in vivo*, em particular na imunoterapia. Relativamente aos tumores sólidos, a aplicação destas moléculas na terapêutica é especialmente interessante uma vez que estas permitem induzir uma ação imunomoduladora diretamente no microambiente tumoral desregulado.

As características particulares destas moléculas e os fatores que influenciam a sua eficácia, serão discutidas neste trabalho, incidindo especialmente na área da oncologia. Por forma a garantir tratamentos eficazes, não só é fundamental garantir a segurança e qualidade destas moléculas durante o processo de fabrico, mas também tornar possível a sua entrega no local de ação. O veículo de entrega escolhido deverá ser capaz de transpor barreiras biológicas, evitar a sua degradação tanto extra como intracelular para assegurar que o agente terapêutico atinge o local de ação em concentrações terapêuticamente relevantes. De facto, a entrega eficiente desta molécula *in vivo* deve ser estrategicamente melhorada, embora se tenham reconhecido vantagens, quando se recorre a veículos de entrega de fármacos não virais como as nanopartículas lipídicas, *charge-altering releasable transporters*, entre outros.

Palavras-chave: mRNA, Imunoterapia, Imunomodulação, Tumores, Veículo de Entrega.

Lista de Abreviaturas

AAT – Antígenos Associados a Tumores

AET – Antígenos Específicos de Tumores

AT – Antígenos Tumoriais

BsAbs – Anticorpos Biespecíficos

CCR – Carcinoma das Células Renais

CPI – *Immune Check-point Inhibitors*

HLA – *Human Leukocyte Antigen* – Antígeno Leucocitário Humano

i.d. – Intradérmica

i.m. – Intramuscular

i.nod. – Intranodal

IT – Intratumoral

i.v. – Intravenosa

mAb – *Monoclonal Antibody* – Anticorpo Monoclonal

MHC – Moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade

NK – *Natural Killer Cells* – Linfócitos T Citotóxicos

NPL – Nanopartículas Lipídicas

PD-I – *Programmed Cell Death Protein 1*

PD-L1 – ligando da *Programmed Cell Death Protein 1*

PEG – Poli(etilenoglicol)

s.c. – Subcutâneo

TIV – Transcrito *in vitro*

VAN – Vacinas de Ácidos Nucleicos

VE – Vesícula Extracelular

3'UTR – *3' Untranslated Region* – Região Não-Codificante 3'

5'UTR – *5' Untranslated region* – Região Não-Codificante 5'

I. Introdução

Apesar da terapia génica já ser utilizada há mais de 30 anos, só recentemente se começaram a utilizar ácidos nucleicos na terapêutica em humanos. Anticorpos, proteínas e células podem ser considerados os agentes terapêuticos de eleição na imunoterapia no tratamento do cancro. São, de facto, inquestionáveis todas as vantagens que estes trazem à prática clínica, no entanto, a imunoterapia possui ainda uma grande margem para melhoria. A ausência de resposta, avanços limitados no tratamento e tolerância específica a fármacos, são alguns dos problemas com que nos deparamos frequentemente neste campo.

Do ponto de vista histórico, as moléculas de RNA nunca foram utilizadas como primeira linha na imunoterapia, provavelmente pelo facto de outras abordagens terapêuticas como os anticorpos monoclonais (mAb), proteínas recombinantes assim com as terapias celulares e as terapias génicas *ex vivo*, terem sido melhor estudadas, documentadas e aplicadas mais prontamente na clínica. Para além disso, a terapia génica com base em plasmídeos DNA ofuscou facilmente as estratégias à base de RNA por estas últimas apresentarem um conjunto de limitações técnicas relativamente à sua estabilidade, indução de efeitos imunes inatos indesejados – imunogenicidade – e problemas na chegada ao local de ação – entrega. Mais tarde, no final do ano 2000, importantes avanços na área da tecnologia farmacêutica ajudaram a ultrapassar algumas das limitações na entrega de fármacos. Assim, com o aparecimento dos lipossomas e das nanopartículas foi possível facilitar a penetração das moléculas de RNA na membrana celular e melhorar a sua resistência à degradação pelas RNases, com o objetivo de melhorar a sua estabilidade em circulação. De facto, ao contrário dos plasmídeos de DNA, ao utilizar moléculas de mRNA não existe qualquer risco de mutações nem da sua integração no genoma da célula uma vez que são moléculas de expressão transitória¹. Esta característica pode ser considerada vantajosa em muitos contextos terapêuticos em relação à expressão permanente de proteínas. Para além disso, o mRNA consegue atingir células que não estejam em divisão por não necessitar de chegar ao seu núcleo para ser transcrito, como acontece com os plasmídeos. Assim, do ponto de vista teórico, a imunoterapia à base de RNA é muito atrativa visto que não acarreta um conjunto de limitações inerentes às proteínas recombinantes e aos plasmídeos de DNA (Tabela I).

É igualmente importante referir que o mRNA pode ser utilizado quer para aumentar a expressão de proteínas e péptidos no meio intracelular como na indução da geração de células estaminais pluripotentes². Adicionalmente, estas moléculas têm sido utilizadas para codificar ZNF (*Zinc Finger Nucleases*), TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) ou mesmo CRISPR-Cas9 (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats* e nuclease Cas9), que,

após a sua administração, poderão ser utilizados para edição genética local³. No que diz respeito às tecnologias que permitem a edição genética do próprio genoma, estas devem ser discutidas separadamente uma vez que apresentam diferenças significativas.

Tabela I: Comparação entre duas VAN: vacinas de DNA e vacinas de mRNA

Vacinas de mRNA	Vacinas de DNA	Refs.
Moléculas grandes e hidrofílicas, carregadas negativamente, que podem apresentar estrutura secundária e terciária.	Moléculas hidrofílicas, neutras, de estrutura bem definida e estável.	150
Vias de administração mais favoráveis: i.d., i.nod.	Via de administração mais favorável: i.m.	31, 33, 34
Incluem somente sequências eucariotas.	Possuem tanto sequências eucariotas como procariotas.	1
Menor risco de contaminação por microrganismos.	Maior probabilidade de contaminação bacteriana e por outros microrganismos.	
Não necessitam de NLS (o mRNA é transcrito no citoplasma, não necessita de entrar no núcleo da célula).	A inclusão de NLS é essencial uma vez que atuam no núcleo das células.	151
Processo de produção mais simples, rápido e barato.	Processo de produção mais complexo, moroso e mais dispendioso.	1, 152
Produção não está dependente de células (obtidas por transcrição <i>in vitro</i> usando moléculas lineares de DNA ou bibliotecas de cDNA e sua posterior purificação).	Produção dependente de células (incluí fermentação bacteriana para a amplificação do plasmídeo, isolamento e posterior purificação).	
Tempo de semivida plasmático mais curto.	Tempo de semivida plasmático mais longo.	43
Menor estabilidade (alterações na sua estrutura e respetivo veículo de entrega permitem aumentar a sua estabilidade).	Melhor estabilidade global - melhor estabilidade ao calor o que permite uma melhor diferenciação e transporte subcelular (necessita sempre de um veículo de entrega).	
Ambas induzem uma resposta pro-inflamatória e a produção de interleucinas, citocinas, quimiocinas como o IFN-I.		154
Induzem mais facilmente uma resposta imune contra o próprio vetor.	Induzem uma resposta imune contra o próprio vetor mais raramente.	
Ambas necessitam de sofrer otimização dos seus codões.		151
É extremamente relevante a inclusão de nucleótidos modificados na sua estrutura.	O design do promotor é muito importante.	
Menor risco de mutagénese (expressão no estado episomal ou expressão temporária).	Maior risco de integração do material genético no genoma da célula aumentando, assim, o risco de mutagénese.	1
Natureza pro-inflamatória mais pronunciada - propriedade intrínseca <i>self-adjuvant</i> vantajosa. Maior probabilidade de desencadear inflamação sistémica e/ou respostas autoimunes.	Pouca natureza pro-inflamatória – não induz imunidade anti-vetor. Menor probabilidade de desencadear uma resposta autoimune.	

cDNA, DNA complementar; i.d., intradérmica; i.m., intramuscular; i.nod., intranodal; NLS, *Nuclear Localization Signal* – Sequência Sinal de Localização Nuclear.

Posto isto, apesar do sucesso da imunoterapia, as estratégias já aplicadas na clínica ainda apresentam algumas falhas relevantes fazendo sentido o desenvolvimento de uma plataforma de agentes terapêuticos à base de moléculas e derivados de RNA que, dado o seu potencial terapêutico, deverão ser considerados complementares ou alternativos às abordagens já existentes. O crescente interesse nestas moléculas fez com que, nos últimos anos, inúmeras indústrias farmacêuticas se debruçassem no estudo da aplicação do mRNA na produção de anticorpos *in situ*, isto é, na otimização das moléculas de mRNA com o objetivo de, após a sua administração, serem capazes de induzir a produção de anticorpos sem provocar uma resposta imune no doente, contrastando com várias estratégias de imunoterapia e tratamentos biológicos disponíveis. Em suma, estes anticorpos não só têm potencial para nos protegerem contra vírus e toxinas, mas também podem ser utilizados e otimizados para outras indicações terapêuticas incluindo no cancro, doenças cardiovasculares e doenças autoimunes.

Ao longo deste trabalho basear-me-ei, essencialmente, nas novas aplicações terapêuticas que utilizam o RNA mensageiro como agente terapêutico na área do cancro, avanços tecnológicos na área, evidências pré-clínicas e clínicas, limitações e perspetivas futuras desta tecnologia emergente.

2. Estrutura Biológica do RNA

As moléculas de RNA são estruturas bastante diversas, apresentando as mais variadas funções e estruturas bioquímicas. As suas funções estruturais, enzimáticas e de codificação e regulação genéticas são, efetivamente, características chave para a vida^{4,5}. É possível distinguir diferentes tipos de RNA de acordo com a sua função: o mRNA codifica toda a informação necessária para a síntese proteica; os RNAs estruturais (como o rRNA e o tRNA) têm atividade enzimática específica ou de ligando; o RNA de interferência (RNAi) é capaz de modula a tradução do mRNA endógeno; e o RNA não codificante de cadeia longa (lncRNA), não codifica proteínas e normalmente tem funções suporte – *scaffolding functions*⁶. Existe também o RNA viral que constitui o genoma de um importante conjunto de genes.

Neste trabalho darei especial importância às moléculas de mRNA. Estas moléculas são unidades intermediárias que transportam informação genética derivada do DNA (genes). Existem três fases principais através das quais a célula obtém proteínas funcionais a partir das moléculas de DNA – transcrição, processamento e tradução. A transcrição divide-se, por sua vez, em iniciação, alongação e terminação. Na iniciação, sequências específicas na região promotora são reconhecidas pelo complexo de transcrição do qual faz parte a RNA

polimerase II em associação com os fatores gerais de transcrição, formando o complexo de pre-iniciação (PIC)⁷. Na elongação, ocorre a remoção do complexo de iniciação, verifica-se a entrada dos fatores de elongação e a RNA polimerase II começa, a partir da sequência promotora do gene, a etapa de elongação propriamente dita. À medida que esta avança, desdobra a cadeia de dupla hélice de DNA na direção 5'-3', copiando a sequência complementar da cadeia correspondente de DNA^{8,9}. Nos eucariotas, cada uma das RNA polimerases tem mecanismos de terminação distintos. A terminação é controlada pelo complexo do fator específico de clivagem e poliadenilação (CPSF), localizado a montante - na extremidade 5' - do exonucleótido conservado, conhecido por sinal de poliadenilação (AAUAAA)¹⁰. O transcrito nascente de mRNA conhecido por pré-mRNA vai então sofrer maturação de forma a ser posteriormente traduzido em proteínas. Esta etapa está dividida em três fases: *Capping* (formação 5' *cap*), processamento (*splicing*) e poliadenilação. O *Capping* ocorre ao longo da transcrição, antes da RNA polimerase II se destacar, e é mediada por três enzimas - mRNA trifosfatase, mRNA guaniltransferase e guanina-N7 metiltransferase. O facto da extremidade 5' do mRNA se encontrar trifosfatada, permite que a polimerase se desligue do complexo e avance ao longo do gene. Esta fosforilação da cauda CTD (*carboxy-terminal domain*) também atrai a enzima guaniltransferase. Após sofrer *capping*, o mRNA passa a ter uma guanosina N7-metilada ligada na extremidade 5'. Esta modificação é essencial para a viabilidade das moléculas de mRNA uma vez que as protege da degradação por exonucleases, sinaliza-as para subsequentes modificações (processamento e poliadenilação) e permite o seu transporte para o citosol (onde se levará a cabo a tradução). Para além disso, já no citosol, permite controlar o início da sua transcrição pelo ribossoma¹¹. Após a sua transcrição, o mRNA sofre um processo complexo através do qual fragmentos de RNA - intrões - são removidos levando à formação do RNA maduro derivado da união de diferentes exões que poderão posteriormente ser traduzidos numa proteína. Este processo é conhecido por processamento ou *splicing*. Por outro lado, o uso alternativo de exões não contíguos - *splicing* alternativo - permite a geração de diferentes transcritos, que codificam diferentes isoformas de proteínas, a partir do mesmo gene^{12,13}. O final da transcrição é marcado, por sua vez, pela poliadenilação. Nesta etapa, o mRNA é clivado na extremidade 3' seguido da adição de uma cauda poliadenosina (poli(A)) pela poli(A) polimerase¹⁰.

Conhecem-se mais de 100 tipos de modificações químicas levadas a cabo dentro das células e que afetam diretamente a estabilidade e distribuição das moléculas de RNA. O conjunto dessas modificações denomina-se epitranscriptoma. Das modificações mais comuns no mRNA temos a adição de bases modificadas como a N⁶-metiladenosina (*m*⁶A) - que permite aumentar o *turnover* de mRNA¹⁴ - e a pseudouridina (Ψ) - que afeta a estrutura das

moléculas de mRNA e aumenta a sua estabilidade¹⁵. Dado o seu papel fundamental na determinação da expressão das moléculas de mRNA, não surpreende que modificações nestas bases tenham um profundo impacto na diferenciação celular, no seu crescimento normal e no aparecimento de doenças. Recentemente, tem-se verificado que algumas destas modificações estão efetivamente relacionadas com o cancro, uma vez que promovem a proliferação das células cancerígenas e o desenvolvimento de resistências à radioterapia^{16,17}.

Finalmente, para ocorrer a tradução do mRNA formado, este necessita de migrar para o citoplasma onde se encontram os ribossomas. Aí, os ribossomas ligam-se às moléculas de mRNA na seção 5'UTR (região não-codificante) procurando um codão de iniciação que, frequentemente, se encontra na proximidade de uma sequência Kozak. O tamanho da região 5'UTR e a presença de elementos *cis*, conhecidos por reguladores, controlam e determinam a eficácia da leitura do mRNA pelos ribossomas e, por sua vez, a taxa da tradução¹⁸.

3. Entrega *in vivo* de mRNA

Inicialmente, mRNA foi utilizado *in vivo* sem veículo de entrega – mRNA livre não otimizado – o que desencadeou uma forte resposta imune alicerçada a uma taxa de efeitos secundários muito reduzida¹⁹. Por este motivo, demonstrou, desde logo, a possibilidade da sua utilização na vacinação. Apesar de uma grande quantidade de mRNA se manter na corrente sanguínea ou ser degradado pelas células nos lisossomas, alguma quantidade tem a capacidade de chegar ao citosol da célula e, por conseguinte, sofrer tradução. É importante referir que foram obtidos resultados positivos principalmente após administração subcutânea (s.c.) ou intramuscular (i.m.) de mRNA não otimizado, enquanto que a administração deste mRNA por via intravenosa (i.v.) induz uma forte resposta imune contra estas moléculas e leva a uma degradação rápida das mesmas por ribonucleases presentes na corrente sanguínea. Esta abordagem tem vindo a ser largamente estudada e utilizada no desenvolvimento de novas vacinas profiláticas. De momento, estão a decorrer numerosos ensaios clínicos nesta área entre os quais uma vacina contra o vírus *zica*²⁰, uma para a Raiva²¹ e outra para o citomegalovirus (CMV)²². Mais recentemente, são várias as companhias que estão a utilizar vacinas à base de mRNA contra o novo coronavírus SARS-CoV-2. As que têm mostrado resultados mais promissores são: uma vacina de mRNA (mRNA-1273), desenvolvida pela indústria Moderna TX, Inc. em colaboração com o *US National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, e que está prestes a iniciar ensaios clínicos de fase 3^{23,24}; e uma vacina, também à base de mRNA, que codifica para o *receptor-binding domain* deste coronavírus, desenvolvida pela empresa BioNTech em parceria com a Pfizer²⁵. De facto, é evidente que as vacinas de mRNA

têm uma capacidade para competirem com as vacinas convencionais de vírus atenuados permitindo obter, por vezes, uma ação superior às últimas relativamente ao número de anticorpos viáveis em circulação e à estimulação das células imunitárias²⁶. Contudo, a administração direta de mRNA não otimizado apresenta uma eficácia limitada uma vez que não promove a expressão significativa da(s) proteína(s) de interesse codificada(s) por esse nucleótido, sendo, por isso, a utilização de mRNA não otimizado somente relevante para o desenvolvimento de vacinas profiláticas.

Para além disso, a escolha dos ácidos nucleicos sintéticos a serem utilizados na prática clínica é extremamente importante por forma a obter uma ação terapêutica de qualidade. Estes são selecionados quer através da seleção de modificações que permitem criar resistências às nucleases, sem afetar a sua função, quer pela sua eficiência na entrega no local de ação específico, sendo este um tecido ou mesmo diretamente no interior de células. O método utilizado para a entrega dos ácidos nucleicos é um processo complexo uma vez que estes têm de ter a capacidade de ultrapassar várias barreiras biológicas até atingirem o citosol das células do tecido alvo (Figura 1).

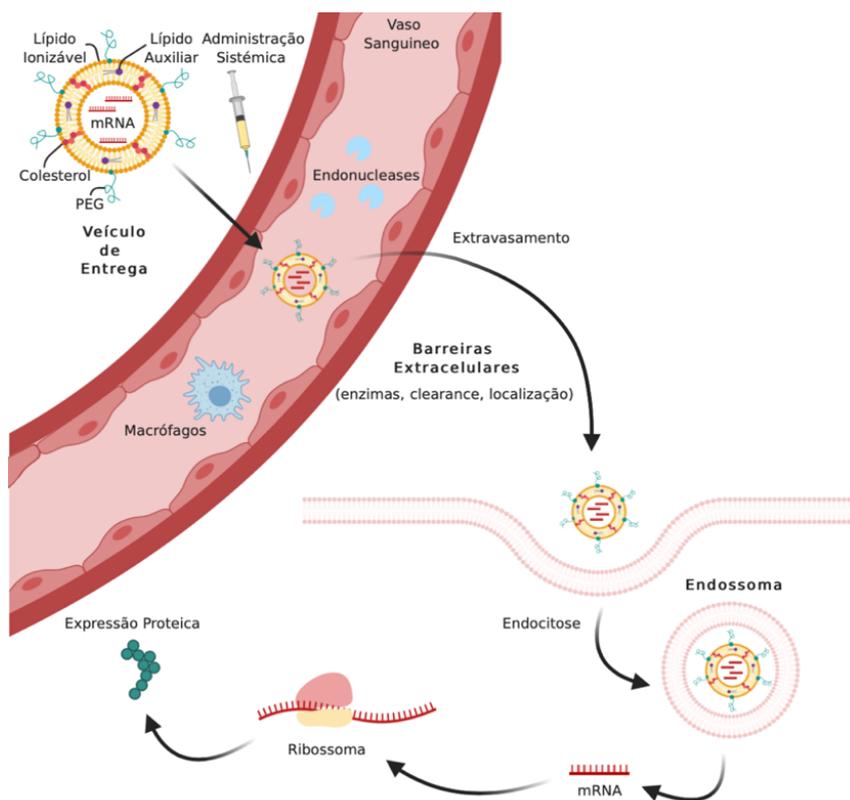


Figura 1: Barreiras biológicas que as moléculas de mRNA têm que transpor para chegar ao local de ação, após administração sistêmica. Depois da sua administração, as moléculas de mRNA deparam-se com diversos desafios fisiológicos que terão de ultrapassar por forma a conseguirem ser traduzidas em proteínas funcionais com sucesso. Inicialmente, devem ser capazes de evitar a ação das endonucleases e fugir à possível endocitose e inativação pelo próprio sistema imunitário. Uma vez em circulação, devem conseguir ultrapassar as diversas membranas e barreiras extracelulares para, por fim, serem capazes, após endocitose pelas células alvo, de fugir à ação lisossomal de forma eficiente e serem libertadas no citosol onde se encontra toda a maquinaria celular necessária para promover a expressão da proteína terapêuticamente relevante.

Em primeiro lugar, estes têm de ser capazes de atingir, em concentração suficiente, o órgão ou tecido alvo. De seguida, deverão passar a membrana celular para finalmente sofrerem tradução, no citosol, utilizando a própria maquinaria da célula.

A principal limitação na entrega deste tipo de fármaco é fazer com que os ácidos nucleicos tenham a capacidade de ultrapassar a membrana celular sem sofrerem qualquer tipo de degradação. Por serem moléculas de elevado peso molecular, aniónicas e hidrofílicas, não conseguem penetrar naturalmente através da bicamada fosfolipídica que constitui a membrana celular. Para além disso, as células animais desenvolveram naturalmente mecanismos de defesa contra ácidos nucleicos exógenos possivelmente patogénicos. Assim sendo, o sistema de entrega ideal pode ser considerado como aquele que permite a passagem dos ácidos nucleicos através da membrana celular, garantindo-lhes proteção contra nucleases e a libertação consequente dos endossomas sem degradação, após endocitose, para posterior tradução, sem que haja ativação do sistema imunitário.

Durante bastante tempo a comunidade científica estudou o potencial terapêutico dos plasmídeos e do mRNA de interferência (*Small Interfering mRNA* – siRNA) o que levou ao desenvolvimento de inúmeros veículos de entrega destas ferramentas de edição genética. Não obstante, nem todos os veículos podem ser utilizados para transportar as diferentes moléculas de RNA. Já foi demonstrado que o *uptake* do mRNA pela célula pode ser influenciado pela composição da solução de injeção²⁷. Por exemplo, a otimização de uma solução de mRNA com Ca²⁺, antes da sua administração *in vivo*, é suficiente para melhorar a sua expressão no local da administração²⁸.

Em suma, é indiscutível que a entrega de mRNA *in vivo* seja crucial para o sucesso da terapêutica e, para isso se verificar, o mRNA tem de penetrar a bicamada fosfolipídica de modo a chegar ao citoplasma e ser traduzido numa proteína funcional. Assim sendo, é importante ter em conta que os mecanismos pelo qual o mRNA é distribuído pelos diferentes órgãos e internalizado pelas células parecem ser dependentes não só das propriedades físico-químicas dos complexos de mRNA mas também do tipo de célula alvo. Até ao momento foram descritas duas estratégias principais para a entrega de mRNA – manipulação e introdução de mRNA em células dendríticas *ex vivo* seguido de reinfusão dessas células transfetadas; e a injeção parentérica direta de mRNA com ou sem sistema de transporte²⁹. Ambas as estratégias têm vantagens e desvantagens. A terapêutica *ex vivo* permite o controlo preciso do alvo celular, da eficiência da transfeção e de outras condicionantes celulares, no entanto, sendo uma terapia celular, trata-se de um método caro e trabalhoso. Por outro lado, temos a injeção direta de mRNA que se trata de uma abordagem mais económica e rápida,

mas ainda não permite um controlo preciso e eficiente da entrega celular, embora se tenha progredido no sentido de melhorar estas limitações³⁰.

3.1. Administração *ex vivo* de mRNA em Células Dendríticas

As células dendríticas são as células do sistema imunitário mais eficientes na apresentação de antigénios. Estas têm a capacidade de internalizar, processar antigénios e de os apresentar aos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ utilizando as principais moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHCs) – MHC classe I e MHC classe II, respetivamente, desencadeando, assim, uma resposta imune adaptativa. Para além disso, as células dendríticas são capazes de apresentar antigénios aos linfócitos B induzindo uma resposta humoral (mediada por anticorpos). Uma vez que é possível transfectar as células dendríticas com mRNA, estas células são consideradas um alvo bastante apelativo tanto para abordagens *in vivo* como *ex vivo*³¹. Embora se tenha demonstrado que as células dendríticas têm a capacidade de internalizar moléculas de mRNA livre através de uma variedade de vias endocíticas, a eletroporação é ainda uma das técnicas mais eficientes neste aspeto. Nesta técnica, as células são submetidas a um impulso elétrico de alta voltagem que cria poros na membrana celular permitindo a entrada das moléculas de mRNA diretamente no citoplasma celular³². Efetivamente, este mecanismo de entrega de mRNA tem sido bastante utilizado uma vez que permite uma transfeção eficiente sem necessidade de um complexo de transporte para o mRNA. Por fim, estas células transfectadas *ex vivo* são reintroduzidas no doente recetor da vacina autóloga de modo a gerar uma resposta imune eficaz mediada por células sendo, por isso, sobretudo utilizadas na área do cancro²⁹.

3.2. Injeção de mRNA Livre *in vivo*

Como vimos anteriormente, o mRNA livre consegue, com sucesso, induzir uma resposta imune *in vivo* essencialmente quando o seu alvo principal são as células apresentadoras de antigénios. Nestes casos, a sua administração é preferencialmente intradérmica (i.d.)³¹ e intranodal (i.nod.)^{33,34}. Um estudo recente demonstrou que imunizações repetidas com mRNA livre, não modificado, que codifica para antigénios associados a tumores (AAT), foi capaz de gerar uma resposta robusta de linfócitos T com aumento da sobrevivência geral dos doentes, inibindo a progressão tumoral, como será referido posteriormente³³.

3.3. Métodos Físicos de Entrega *in vivo*

A aplicação *in vivo* de métodos físicos é bastante limitada uma vez que estes provocam morte celular e restringem o acesso somente às células do tecido alvo. Em consequência, a utilização dos restantes métodos enunciados tem sido preferencial no campo da terapêutica com mRNA.

3.4. Protamina

O primeiro sistema de entrega de mRNA *in vivo* a ser desenvolvido utilizou a capacidade das protaminas (proteínas nucleares ricas em arginina com uma massa molecular de aproximadamente 4 kDa³⁵) de formarem complexos com os ácidos nucleicos protegendo-os contra nucleases^{36,37}. Porém, estes complexos não se mostraram particularmente vantajosos no campo da imunoterapia e em terapêuticas de substituição, uma vez que desencadearam uma elevada imunogenicidade. De facto, um modelo de vacina para o cancro que utiliza um complexo de mRNA com protamina como agente ativo, mostrou uma expressão proteica limitada e, por conseguinte, uma eficácia reduzida, provavelmente devido à forte associação entre a protamina e o mRNA³⁸. Foi então desenvolvida uma plataforma de vacinas - RNAActive® – na qual o RNA formulado associado a protamina serve apenas como ativador imunológico e não como vetor de expressão^{39,40}. Por exemplo, a CureVac AG, uma indústria biotecnológica alemã, comercializa este tipo de agentes terapêuticos.

3.5. Lípidos Catiónicos e Veículos Poliméricos

Encontram-se comercialmente disponíveis vários reagentes de transfeção com base em lípidos catiónicos e polímeros, contudo, muitos deles possuem uma aplicabilidade limitada *in vivo* devido à sua toxicidade. Na tentativa de solucionar este problema, têm-se verificado bastantes progressos nesta área com o objetivo de desenvolver reagentes mais seguros e eficazes para utilização *in vivo*^{41,42,43}.

Nos últimos anos, lípidos e polímeros catiónicos, incluindo dendrímeros, têm sido amplamente utilizados na administração de mRNA. De facto, o campo da terapêutica com mRNA beneficiou bastante de todo o conhecimento no que diz respeito à administração de nucleótidos *in vivo* desenvolvido para a administração de siRNA, onde estes veículos já são utilizados há mais de uma década. As nanopartículas lipídicas (NPL) tornaram-se, assim, uma das ferramentas de entrega de mRNA mais utilizadas. Na sua generalidade, consistem em quatro componentes, nomeadamente, um lípido catiónico ionizável, que permite a formação de micelas (de aproximadamente 100nm), capaz de induzir a libertação endossómica do

mRNA no citoplasma; poli(etilenoglicol) (PEG) ligado a outros lípidos que permitem aumentar a estabilidade das formulações prolongando o seu tempo de semivida plasmático; colesterol que funciona como agente estabilizante; e fosfolípidos que têm a capacidade de formar uma bicamada lipídica tendo, assim, uma função de suporte. Os estudos que demonstram eficácia na utilização de NPL na entrega tanto de *self-amplifying RNA*^{44,45} como de mRNA convencional *in vivo*⁴⁶ são bastante recentes. Na utilização de vacinas de mRNA-NPL é possível controlar a intensidade e duração da produção de proteínas *in vivo*, em parte variando a via de administração. De facto, foi demonstrado que a administração i.d. e i.m. de mRNA-NPL resulta numa expressão proteica mais prolongada do que pelas vias sistémicas. Um estudo mostrou que o tempo de semivida plasmático da luciferase codificada por mRNA foi aproximadamente três vezes mais longo que após a sua administração i.v.⁴⁶. Para além disso, a administração sistémica destes complexos tem como alvo principal o fígado devido à sua forte ligação à apolipoproteína E o que leva à sua subsequente captação pelo seu recetor na superfície dos hepatócitos⁴⁷.

Na última década surgiram as *Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles* (LPHNs) que combinam as vantagens dos veículos poliméricos e dos lipídicos. Este veículo de entrega de fármacos é biodegradável, estável e possui um tempo de circulação naturalmente longo⁴⁸. Adicionalmente, alterando a sua composição e polaridade lipídica, este veículo consegue adquirir características específicas que favorecem a entrega do fármaco. Após encapsulação com LPHNs, é possível ocorrer evasão do tecido endotelial e internalização pelas células uma vez que estas partículas ultrapassam a membrana celular de forma eficiente, promovem uma libertação endossomal bastante eficaz e, caso seja necessário, migração nuclear⁴⁹.

De um modo geral, para a entrega destas moléculas procuram-se polímeros de baixo peso molecular uma vez que estes geram partículas de pequeno tamanho o que, por sua vez, favorece a absorção celular. Efetivamente, partículas de baixo peso molecular permitem uma ligação superficial mais firme resultando num revestimento mais duradouro. Como consequência, uma variedade de nanopartículas tanto lipídicas como poliméricas têm sido desenvolvidas para promover a entrega de moléculas de mRNA⁵⁰. No entanto, ambos os tipos ainda apresentam uma fraca transfeção celular. As LPHNs carregadas com mRNA já foram utilizadas na transfeção de células dendríticas de forma eficaz e rápida, promovendo tradução proteica. No entanto, a expressão do gene de interesse ainda é superior utilizando outros veículos de entrega^{51,52}. Consequentemente, serão provavelmente necessárias pesquisas adicionais nesta área uma vez que os processos através dos quais o mRNA é internalizado pelas células e libertado no citoplasma ainda são bastante desconhecidos.

3.6. Vesículas Extracelulares

As vesículas extracelulares (VE) são um grupo mais heterogéneo de elementos vesiculares de origem celular que podem derivar ou de um compartimento intracelular – exossomas (50 – 150 nm) – ou de excertos da membrana celular – microvesículas (100 – 1,000 nm), oncosomas (1,000 – 10,000 nm) e corpos apoptóticos (100 – 5,000 nm). Estas vesículas são bastante heterogéneas no que diz respeito ao seu tamanho, morfologia e conteúdo. De facto, o conteúdo em RNA das VE reflete tanto o tipo como o estado fisiológico/patológico da célula que lhes deu origem^{53,54,55}. Do mesmo modo, esse conteúdo em RNA pode diferir bastante entre vesículas, mais especificamente, no que diz respeito ao tipo e às concentrações relativas de sequências específicas de RNA⁵⁶.

Estas vesículas são capazes de transportar uma variedade de compostos incluindo proteínas, lípidos, DNA e RNAs, que posteriormente serão internalizados por outras células quer na sua vizinhança como em locais mais distantes, podendo induzir uma variedade de respostas fenotipicamente distintas. Uma vez que as VE transportam conteúdo específico derivado das células que as produziram, estas podem ser utilizadas como biomarcadores para uma variedade de doenças. Por outro lado, o potencial que as vesículas extracelulares demonstram tanto na proteção dos ácidos nucleicos e de outras macromoléculas da degradação *in vivo* como na entrega seletiva em células alvo específicas, sem induzir a ativação do sistema imunitário, tem despertado, essencialmente durante a última década, um interesse especial da comunidade científica na utilização destes sistemas como veículos de entrega de moléculas terapêuticamente relevantes (incluindo mRNAs) com o objetivo de modular a expressão genética e a função da célula alvo.

Características específicas das moléculas de RNA como o seu pequeno tamanho, alta abundância, capacidade de se associarem a membranas e localização citoplasmática favorecem a sua internalização em vesículas extracelulares⁴³. Para além disso, a internalização destas vesículas pelas células alvo pode, também, ser favorecida na sua superfície através da inclusão de algumas moléculas, entre as quais proteínas/peptídeos, anticorpos, compostos lipídicos e mesmo aptâmeros de RNA⁵⁷. Foi já descrita a integração de recetores da integrina em VE com o objetivo de induzir a sua internalização de forma seletiva por células de alguns tumores⁵⁸, assim como, a inclusão de um “nanocorpo” relacionado com o recetor do fator de crescimento epidérmico na sua superfície por forma a permitir o direcionamento das vesículas para células tumorais que expressem este recetor⁵⁹. Como nenhuma estratégia é perfeita, há sempre o risco destes ligandos expostos na superfície das VE – especialmente aqueles na forma de oligonucleótidos não protegidos e péptidos/proteínas – de poderem ser degradados nos

fluidos biológicos por RNases e proteases respetivamente, impedindo, assim, a sua sinalização^{60,61}.

No que diz respeito à transferência funcional da VE, é extremamente importante ter em conta o tipo de célula de qual as vesículas são obtidas uma vez que estas vesículas podem ter diferentes fontes celulares, dependendo da sua finalidade terapêutica^{62,63}. As VE derivadas de células tumorais, carregadas com AATs, também podem ser usadas na indução de respostas imunes antitumorais, contudo, há um risco acrescido que as VE derivadas de células imortalizadas ou de células tumorais possam transportar fatores oncogénicos e contribuir para o desenvolvimento do cancro⁶⁴.

Relativamente ao carregamento das VEs, este pode ser realizado de duas formas: endogenamente, por modulação da célula doadora por forma a promover a inclusão da carga selecionada nas vesículas produzidas; ou exogenamente, caso a carga a incluir nas VEs seja carregada em vesículas isoladas *in vitro*.

Na maior parte dos casos, estas vesículas serão utilizadas como veículo de entrega de moléculas terapêuticas em tecidos lesados ou em tecidos tumorais e a sua administração terá de ser repetida no decorrer do tratamento. Relativamente à utilização de VEs como veículo para administrar terapêuticas com RNA, estas apresentam diversas vantagens entre as quais menor risco de resposta imune contra o veículo de entrega, uma vez que estas vesículas podem ser obtidas de uma variedade de fontes incluindo de células do próprio doente (neste caso seriam imunologicamente neutras); permitem a incorporação de diversos tipos de ligandos na sua superfície (ação direcionada); formam uma bicamada lipídica protetora; e permitem o transporte de RNA e de outros agentes terapêuticos, em simultâneo. Ainda que apresentem algumas limitações associadas essencialmente com a fraca homogeneidade e complexidade do processo de produção, já existem ensaios clínicos a utilizarem VEs como veículos de entrega de RNA⁶².

As principais vantagens associadas ao uso de VE em comparação com outras estratégias de entrega de RNA como as NPL sintéticas ou moléculas de RNA livres modificadas incluem menor imunogenicidade e toxicidade^{65,66}, melhor capacidade de atravessar barreiras biológicas⁶⁷ e o potencial de alcançar uma entrega mais eficiente, mantendo a possibilidade de incorporar moléculas sinalizadoras e de carregar moléculas de RNA tanto endógenas como sintéticas⁶⁸. Seria importante que tanto a investigação em VEs como em NPL/lipossomas se cruzasse e cooperasse no sentido de desenvolver novas estratégias terapêuticas aproveitando as vantagens de ambos os sistemas de entrega.

Os principais ensaios clínicos em que foram aplicados estes veículos de entrega usaram VEs como vacinas para tumores. De facto, VEs derivadas de células dendríticas, que expressam

na sua superfície moléculas MHC e que transportam peptídeos específicos do tumor no seu interior, mostraram-se uma estratégia de entrega de antígenos imunogênicos tumorais eficiente⁶⁹. Por conseguinte, no sentido da aplicação das VEs como vacinas, estas foram igualmente utilizadas na entrega *in vivo* de mRNAs que codificam para proteínas patogênicas de modo a induzindo uma resposta imune e potenciando a vacinação sem a necessidade de gerar e desativar vírus ou bactérias patogênicas⁷⁰. Para além disso, com a utilização de VEs derivadas de células dendríticas carregadas com RNA total ou derivado de lisados tumorais foi possível induzir a produção local de Antígenos Específicos de Tumores (AET)⁷¹. Foi de igual forma demonstrada a aplicação destas vesículas como vacinas antitumorais uma vez que VEs derivadas de tumores são capazes de induzir uma ação antitumoral mediada por células dendríticas, capaz de diminuir a taxa de crescimento tumoral. Neste caso, VEs tumorais podem ser usadas diretamente ou então serem isoladas e posteriormente introduzidas em células dendríticas *ex vivo* antes da sua reintrodução no doente – vacinas para o cancro à base de células dendríticas – apresentando um grande potencial terapêutico.

4. Aplicações Terapêuticas do mRNA

O mRNA apresenta diferentes aplicações promissoras nas mais diversas áreas científicas. Poderá não só ser útil na imunoterapia no tratamento do cancro como na vacinação contra doenças infecciosas, na terapia de substituição ou mesmo na medicina regenerativa. Essencialmente irei fazer referência às possíveis aplicações desta tecnologia no campo da imunoterapia, dando especial atenção à sua aplicabilidade no tratamento de tumores sólidos.

Na sua generalidade, as moléculas de RNA têm a capacidade de induzir a libertação de diversas citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12. Após terem entrado em contacto com as células sanguíneas, as moléculas de mRNA também estimulam a secreção de interferões do tipo I (INF- α e INF- β), quimiocinas GRO, MCP-1, RANTES e MDC⁷². De um modo geral, estas substâncias ativam tanto as células imunitárias da resposta imune inata como da adaptativa. As células ativadas responsáveis pela resposta imune adaptativa são as células apresentadoras de antígenos tais como as células dendríticas, os linfócitos B (produtores de anticorpos, células de memória) e os macrófagos ativados. Convém realçar que a ativação destas células pode nem sempre ser benéfico para o fim terapêutico pretendido, por exemplo, no campo da terapêutica de substituição, a ativação destas células pela utilização de moléculas de mRNA poderá agravar o prognóstico.

Presentemente, estão a ser estudados e desenvolvidos diversos mRNAs anticancerígenos, ou seja, que têm a capacidade de estimular uma resposta imune do próprio

indivíduo contra as suas células cancerígenas. Por conseguinte, o potencial terapêutico desta nova ferramenta está já a ser estudado em diversos ensaios pré-clínicos e clínicos (Tabela 2). A sua principal vantagem baseia-se na capacidade de se vir a desenvolver uma terapia personalizada para o cancro, tendo em conta as mutações individuais de cada doente.

Tabela 2: Ensaios clínicos de terapêuticas contra o cancro usando moléculas de mRNA – vacinas de mRNA e vacinas de mRNA personalizadas para o cancro.

Instituição Patrocinadora	Tipo de Vacina (via de administração)	Alvos	Referência do ensaio clínico (Fase)	Estado
BioNThech RNA Pharmaceutical GmbH	BNT112 PRO-MERIT lipoplexos de mRNA AAT (i.v.)	Cancro Prostático	NCT04382898 (I/II)	A recrutar
	BNT111 Lipo-MERIT Complexo Lipossómico de mRNA AAT (i.v.)	Melanoma	NCT02410733 (I)	A recrutar
	BNT111 mRNA livre AAT (i.nod.)	Melanoma	NCT01684241 (I)	Completo
	BNT122/RO7198457 mRNA neoantígenos individualizados (i.v.)	Melanoma	NCT03815058 (II)	A recrutar
	BNT122/RO7198457 mRNA neoantígenos individualizados (i.v.)	Melanoma; NSCLC; Cancro de bexiga; Cancro colorretal; Cancro da mama (TNBC); Cancro renal; HNC Outros cancros sólidos	NCT03289962 (Ia/Ib)	A recrutar
	BNT113 Complexo lipossómico de mRNA AAT (i.d.)	HPV16+ HNC	NCT03418480 (I/II)	Temporariamente suspenso
	BNT114 MERIT IVAC® Complexo lipossómico de mRNA AAT e Neoantígenos (i.v.)	Cancro da mama (TNBC)	NCT02316457 (I)	Ativo
	BNT115 Complexo lipossómico de mRNA AAT (i.v.)	Cancro dos ovários	NCT04163094 (I)	A recrutar
	BNT131 SAR441000 mRNA de moléculas imunomoduladoras (inj.int.)	AST	NCT03871348 (I)	A recrutar
Changhai Hospital	Personalized mRNA Tumor Vaccine que codifica para neoantígenos (s.c.)	AESC; Adenocarcinoma Gástrico; Adenocarcinoma Prostático; Adenocarcinoma Colorretal.	NCT03468244 (n.a.)	A recrutar
Cure Vac AG	CV9202 mRNA RNActive® AAT (i.d.)	NSCLC	NCT00923312 (I/II)	Completo
			NCT01915524 (I)	Interrompido
			NCT03164772 (I/II)	A recrutar
	Cancro da Próstata	NCT02140138 (II)	Interrompido	

			NCT00831467 (I/II)	Completo
			NCT01817738 (I/II)	Interrompido
	CV8102 TLR7/8/RIG-I agonista ssRNA (inj.int.)	cMEL; cSCC; hnSCC; ACC	NCT03291002 (I)	A recrutar
ModernaTX, Inc.	mRNA-2416 mRNA que codifica para OX40L encapsulado numa NPL (inj.int.)	Tumores sólidos; Linfomas; Cancro dos ovários.	NCT03323398 (I/II)	A recrutar
	mRNA-4157 PCV	Tumores Sólidos	NCT03313778 (I)	A recrutar
		Melanoma	NCT03897881 (II)	A recrutar
	mRNA-2752 mRNAs que codificam para o triplete de moléculas imunomoduladoras - OX40L, IL-23 e IL36 γ (inj.int)	Tumores sólidos refratários ou linfoma; TNBC; hnSCC; NHL; Cancro urotelial.	NCT03739931 (I)	A recrutar
National Cancer Institute USA (NCI)	Personalized mRNA Cancer Vaccine: NCI-4650 (i.m.)	Melanoma; Cancro Colorretal; Cancro Gastrointestinal; Cancro Geniturinário; Cancro Hepatocelular.	NCT03480152 (I/II)	Terminado
Stemirna Therapeutics	Personalized mRNA Tumor Vaccine que codifica para neoantígenos (s.c.)	Cancro Esofágico; NSCLC.	NCT03908671 (n.a.)	Ainda não está a recrutar
University Hospital Tübingen	mRNA que codifica para AAT associado à proteína GM-CSF (i.d. e s.c.)	Melanoma	NCT00204516 (I/II)	Completo
	Complexo de protamina com mRNA que codifica para AAT associado à proteína GM-CSF (i.d. e s.c.)	Melanoma	NCT00204607 (I/II)	Completo
University of Florida	RNAActive® – CV9103 (desenvolvido pela CureVac AG) mRNA que codifica para AAT (i.d.)	Cancro Prostático	NCT00906243 (I/II)	Terminado

Esta tabela sumariza os ensaios clínicos registados em ClinicalTrials.gov a 3 junho 2020.

AAT, antígeno associado ao tumor; AESC, *advanced esophageal squamous carcinoma*; AST, *advanced solid tumour*; GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; HNC, *Head and Neck Cancer*; i.d., intradérmico; inj.int., injeção intratumoral; i.m., intramuscular; i.nod., injeção intranodal; i.v., intravenoso; IVAC, *Individualized Cancer Immunotherapy*; MERIT, *The Mutanome Engineered RNA Immuno-Therapy*; n.a., não aplicável; ND, não disponível; NHL, *Non-Hodgkin Lymphoma*; NPL, Nanopartícula Lipídica; PCV, *Personalized Cancer Vaccine*; s.c., subcutâneo; TNBC, *Triple Negative Breast Cancer*.

Como já foi referido, estes fármacos à base de mRNA provocam a ativação de respostas imunes mediadas pelo Interferão do tipo I o que poderá ter um impacto negativo na tradução das proteínas e, por conseguinte, no efeito terapêutico. No caso das vacinas antitumorais à base de mRNA, a ativação prematura de respostas mediadas pelo INF tipo I poderá ser prejudicial para o desempenho da vacina provocando um bloqueio na tradução do mRNA, levando a uma diminuição da quantidade de antígeno expresso. Este efeito poderá também ser causado pelo IFN α e IFN β devido à sua ação antiproliferativa e proapoptótica

sobre os linfócitos T⁷³. Assim, a ativação tanto dos sensores celulares de RNA exógeno como de uma resposta mediadas pelo INF tipo I causam um efeito negativo na tradução do mRNA que codifica proteínas terapêuticas sendo, por isso, considerado um obstáculo relevante à utilização de moléculas de mRNA terapêuticamente. Na tentativa de atenuar estas respostas pro-inflamatórias foi estudado o efeito da incorporação de nucleósidos modificados nas moléculas de mRNA – como a pseudouridina, 5-metiluridine, *N*¹-metilpseudouridina, 2-tiouridina, *m*⁶A ou *m*⁵C – verificando-se um impedimento da sinalização dos recetores de mRNA intracelulares – TLR3, TLR7 e TLR8 – bem como a própria ligação a TLR3, TLR7, TLR8 e RIG-I^{74,75}. Estes últimos podem reduzir a libertação de citocinas e/ou melhorar a expressão proteica em comparação com os mRNAs não modificados^{74,75,76}.

Em suma, podemos concluir que moléculas de mRNA modificadas são uma mais valia para a terapêutica permitindo uma tradução mais eficaz do mRNA e, por sua vez, um melhor efeito terapêutico. Efetivamente, o impacto de todas as modificações no mRNA tais como a adição de nucleótidos modificados, a purificação das moléculas, a sua otimização, a sua capacidade de ativação dos recetores de RNA celulares e o desencadear de uma resposta imune inata, muito provavelmente dependerão do veículo de entrega e dos tecidos, células e compartimentos intracelulares alvo destas moléculas terapêuticas.

Atualmente existem duas abordagens terapêuticas nas quais a utilização de moléculas de mRNA apresenta um maior potencial terapêutico no tratamento de tumores: as vacinas para o cancro convencionais e a imuno-oncologia intratumoral. Mais recentemente surgiram outras duas aplicações destas moléculas na oncologia: as vacinas de mRNA personalizadas para o cancro e as vacinas de mRNA que codificam para anticorpos. O conhecimento clínico destas duas últimas abordagens ainda é bastante limitado, contudo, surgem cada vez mais resultados promissores de ensaios clínicos que apoiam a sua breve introdução na prática clínica corrente.

4.1. Vacinas Antitumorais

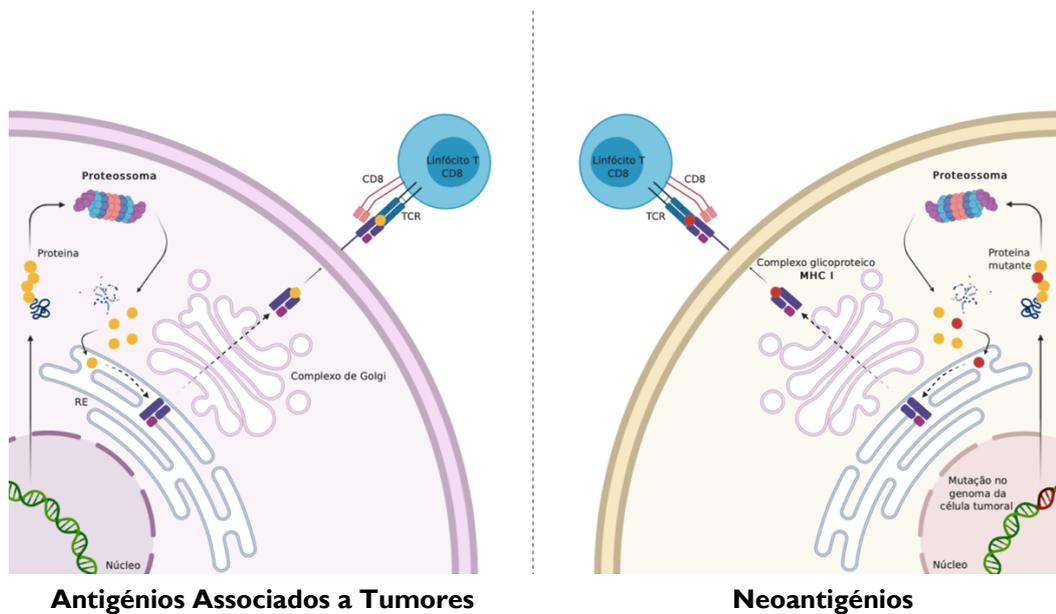
As vacinas para o cancro têm sido estudadas durante décadas, mas só agora se está a constatar o seu verdadeiro potencial terapêutico. Estas incluem as vacinas peptídicas, as vacinas de base celular, vacinas de vetores virais e as vacinas de ácidos nucleicos (VAN). Todas estas vacinas têm como finalidade desencadear ou aumentar uma resposta imune contra antigénios expressos mais ou menos especificamente pelas células tumorais. Estes antigénios podem ser, por exemplo, fatores de crescimento tumoral ou então antigénios que são únicos para células malignas devido a mutações somáticas⁷⁷. Os neoantigénios, ou mesmo os neoepítomos que os constituem, foram considerados alvos para as vacinas de mRNA em

humanos⁷⁸. Entre os diferentes tipos de vacinas contra o cancro estudadas, as VAN, como as vacinas de mRNA, foram consideradas bastante relevantes uma vez que o seu processo de fabrico é seguro, simples e rápido⁷⁹.

A maioria das vacinas contra o cancro são terapêuticas, ou seja, têm como objetivo induzir uma resposta imune mediada por células, contra antígenos derivados de tumores ou antígenos tumorais (AT). De uma forma geral, os ATs têm um papel central tanto no início como em todas as etapas de desenvolvimento do tumor^{79,80}. Estes incluem tanto os AATs como os AETs (Figura 2). Alguns AAT, para além de serem bastante específicos e muito pouco ou nada expressos em células somáticas adultas saudáveis, apresentam o mesmo perfil de expressão em vários doentes e em vários tipos de tumores o que os caracteriza como bons candidatos para a imunoterapia. Por outro lado, os auto-antígenos mutados ou AETs, também conhecidos por neoantígenos, requerem a sua deteção e identificação individual no tecido tumoral. Apesar deste processo ser bastante moroso e trabalhoso, a sua utilização apresentou uma eficácia aumentada em ensaios clínicos em comparação com os AATs. Note-se ainda que os AAT têm sido mais estudados do que os neoantígenos em VAN para o cancro⁸¹.

De modo a compreender o mecanismo de atuação das vacinas à base de mRNA, é importante ter em consideração o papel indispensável das moléculas MHC I na apresentação de antígenos tumorais e, por conseguinte, no sucesso da imunoterapia baseada nas células T⁸². De um modo geral, os epítomos dos antígenos tumorais ligam-se às moléculas de classe I e II do MHC localizadas na superfície das células dendríticas. Estas têm a capacidade de ativar a resposta imunitária humoral (produção de anticorpos) assim como de induzir a imunidade mediada por células.

Já foi verificada, em vários tipos de cancro, uma expressão reduzida ou mesmo perda de expressão das moléculas MCH de classe I pelas células tumorais o que está, por sua vez, associado a uma capacidade reduzida dos linfócitos T em infiltrar o tecido tumoral e na fuga das células imunitárias⁸³.



- Antígenos Associados a Tumores**
- Expressos em múltiplos tumores;
 - Risco elevado de auto-tolerância;
 - Suscetíveis a seleção imune;
 - Risco aumentado de resposta autoimune.

- Neoantígenos**
- Característico de cada tumor;
 - Menor risco de auto-tolerância;
 - Resistente à seleção imune;
 - Menor risco de resposta autoimune.

Figura 2: Os antígenos tumorais incluem tanto os AATs como os AET ou neoantigêneos. Tipicamente, os AATs são derivados de proteínas normais com alta expressão no tecido tumoral, mas com expressão limitada nos tecidos normais. Embora ambos os tipos de ATs estejam presentes no desenvolvimento e progressão do tumor, eles são distintos do ponto de vista imunológico. O mesmo AAT pode ser expresso por vários tipos de tumores e o organismo facilmente desenvolve tolerância imune a estas moléculas. Contrariamente, os AETs são característicos de cada tumor e as terapêuticas imunológicas direcionadas para estes antígenos têm menor probabilidade de induzirem respostas autoimunes que os anteriores. É importante notar que o padrão mutagênico dos AETs varia consideravelmente entre os diferentes tipos histológicos de cancro. (Adaptado de Zhang *et al.*, 2017).

Tanto inoculações i.m. como cutâneas de *cassettes* de DNA mostraram-se eficazes na indução de respostas específicas mediadas por anticorpos e células T contra os antígenos codificados tendo surgido, deste modo, um interesse na vacinação com ácidos nucleicos (vacinação genética)⁸⁴. Particularmente nas vacinas contra o cancro, as vacinas de DNA mostraram-se pouco úteis, uma vez que induzem fracamente o sistema imunitário e não permitem uma diferenciação sólida dos linfócitos CD4⁺ produtores de IFN γ e dos linfócitos CD8⁺⁸⁵. Estas vacinas já foram extensamente descritas na literatura científica, não obstante, nesta secção irei abordar essencialmente as VAN que utilizam mRNA como ferramenta terapêutica e os avanços mais recentes neste campo.

Posto isto, os primeiros estudos publicados datam desde há duas décadas e, não só apresentaram a ideia de vacinas de RNA contra o cancro, mas provaram também a sua viabilidade^{86,87}. Desde então, vários estudos pré-clínicos e clínicos têm vindo a comprovar a mais valia na utilização das vacinas de mRNA no combate do cancro (Tabela 2).

O objetivo principal das vacinas para o cancro é induzir ou aumentar a resposta imune específica contra as células cancerígenas expondo o corpo aos ATs integrados numa formulação o mais imunogénica possível. A longo prazo, pretende-se aumentar as respostas imunes capazes de erradicar as células tumorais e induzir a criação de uma memória imunogénica no doente para esse mesmo cancro, isto é, imunizar o doente contra o próprio cancro. Para que esta imunização seja bem-sucedida, é necessário ter em conta alguns obstáculos importantes. Primeiro, as sequências de proteínas codificadas pela linha germinativa podem ter eliminado ou induzido a perda de função dos linfócitos T que expressam recetores dos linfócitos T (TCRs) funcionais; segundo, em doentes portadores de tumores, tanto os linfócitos T como as células dendríticas estão sob a influência de muitos mecanismos imunossupressores, incluindo interações com a *programmed cell death protein 1* (PD-1) e o ligando da PD-1 (PD-L1); e terceiro, como já referi anteriormente, a identificação individualizada dos neoantigénios é tecnicamente bastante exigente e complexa⁸⁸.

Neste tema irei abordar quatro tipos distintos de vacinas para o cancro onde são aplicadas moléculas de mRNA: vacinas de mRNA para o cancro à base de células dendríticas; Imuno-oncologia Intratumoral; vacinas de mRNA personalizadas para o cancro; e vacinas de mRNA que codificam anticorpos.

4.1.1. Vacinas de mRNA para o Cancro à base de Células Dendríticas

Uma vez que as células dendríticas são um fator essencial para o início de uma resposta imune específica contra antigénios, parece lógico utilizá-las na imunoterapia contra o cancro. *Boczkowski et al.* em 1996 demonstraram, pela primeira vez, que células eletroporadas com mRNA poderiam induzir respostas imunes potentes contra antigénios tumorais⁸⁷.

Nesta técnica, as células dendríticas devem ser manipuladas *ex vivo* onde lhes é transfetado o mRNA que codifica os antigénios de interesse. É ainda possível utilizar o mRNA tumoral total isolado de uma biópsia de tecido tumoral. A forma mais simples de transfectar as células dendríticas com epítomos derivados de antigénios tumorais é utilizar antigénios sintéticos. Isto foi demonstrado nos primeiros ensaios clínicos com células dendríticas com o objetivo de induzir uma resposta imune contra o tumor correspondente⁸⁹; este processo exige, no entanto, que o doente possua um haplótipo HLA específico para o qual existem epítomos adequados. A exploração do repertório antigénico tumoral completo levanta algumas preocupações, uma vez que, não só poderá provocar uma sobre-expressão de antigénios, como também a expressão de proteínas que possam ter sofrido mutações (tanto

mutações passageiras como mutações oncogénicas) em simultâneo como a classe de neoantígenos de interesse terapêutico⁹⁰.

Foram, também, identificadas uma variedade de proteínas imunoreguladoras capazes de aumentar a potência das vacinas de células dendríticas contra o cancro que são conhecidas como adjuvantes codificados por mRNA. Vários estudos demonstraram que a eletroporação de células dendríticas com mRNAs que codificam moléculas co-estimuladoras como CD83⁹¹, membro da superfamília do fator de necrose tumoral 4⁹² – TNFRSF4, também conhecido por OX40 – e o ligando 4-1BB (4-1BBL) resultou num aumento substancial da atividade imunoestimulatória das células dendríticas⁹³. Por outro lado, as funções das células dendríticas também podem ser moduladas pelo uso de moléculas de mRNA que codificam citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 12 (IL-12)^{94,95}. De uma forma geral, os ensaios clínicos documentados que utilizam esta terapêutica demonstraram, em doentes com alta carga tumoral e tolerância parcial a AATs, respostas imunes específicas contra o antígeno de interesse com atividade antitumoral moderada muito possivelmente devido aos mecanismos imunossupressores destes doentes⁸³.

TriMix é um cocktail de moléculas de mRNA que codificam adjuvantes imunoestimuladores (CD70, ligando CD40 (CD40L) e TLR4 ativo constitutivamente) que podem ser eletroporados em combinação com mRNA ou mRNAs que codifiquem antígeno/s de interesse terapêutico⁹⁶. Esta formulação mostrou-se eficaz em vários estudos pré-clínicos, levando a um aumento da ativação das células dendríticas e alterando o fenótipo dos linfócitos T CD4+ de linfócitos T reguladoras para linfócitos T helper 1⁹⁶. Existe, também, uma estratégia de co-transfecção de TriMix em células dendríticas derivadas de monócitos onde estas foram co-eletroporadas com mRNA que codifica antígenos de melanoma de tamanho completo – antígeno associado a melanoma 3 (*melanoma-associated antigen A3* – MAGE-A3), antígeno associado a melanoma C2 (*melanoma-associated antigen C2* – MAGE-C2), tirosinase e antígeno específico da linhagem de melanócitos GPI00 (*melanocyte lineage-specific antigen GPI00*, também conhecido como PMEL) e um conjunto de mRNAs que visam ativar células dendríticas de forma a induzir uma imunidade mediada por células T CD8+⁹⁷.

Uma nova abordagem terapêutica combina a eletroporação de células dendríticas com moléculas de mRNA que codificam agentes tradicionais quimioterapêuticos ou *immune checkpoint inhibitors* (CPI). A formulação Trimix, descrita anteriormente, que inclui também genes imunoestimuladores (CD70, CD40L e TLR4 ativo constitutivamente), sob a forma de moléculas de mRNA, capazes de induzir a maturação das células dendríticas e co-estimulação das células T⁹⁸, após se ter mostrado eficaz em vários ensaios pré-clínicos²⁸, foi aplicada em ensaios clínicos de fase I/2. Nestes ensaios foram testadas, em simultâneo, uma administração

i.d. e i.v. do produto das células dendríticas geneticamente modificadas de forma transitória (desenvolvido pela eTheRNA)⁹⁹. Nesse estudo clínico esta formulação foi estudada em 15 doentes com melanoma avançado (estadio III ou IV) mostrando-se segura e imunogénica e foi capaz de induzir a remissão completa do tumor a 2 dos doentes submetidos à terapia celular (verificou-se regressão tumoral em cerca de 27% de todos os indivíduos)⁹⁹. Para além disso, este produto foi utilizado em combinação com anti-CTLA4 mAb (*anti-cytotoxic T lymphocyte protein 4 - CTLA4*) – ipilimumab – num estudo de fase 2 de braço único. Esta formulação mostrou uma taxa geral de resposta tumoral de 38%. Dos 39 doentes com melanoma de estadio IV sujeitos ao ensaio, 8 obtiveram uma resposta completa ao tratamento e 7 obtiveram uma resposta parcial¹⁰⁰. Tendo em consideração que a taxa normal de resposta ao ipilimumab em monoterapia é geralmente inferior a 20%, estes resultados podem ser considerados relevantes mesmo na ausência de um estudo randomizado¹⁰⁰. Apesar de esta associação se mostrar bastante promissora, têm sido igualmente estudados outros fármacos normalmente utilizados em quimioterapia, como a cisplatina, não apresentando, contudo, grande relevância nessa associação quando comparada a monoterapia com a vacina de células dendríticas¹⁰¹. Estão, ainda, sob investigação em estudos clínicos, preparações principalmente com mAbs anti-PD-I, menos tóxicos e mais eficazes¹⁰².

Uma das abordagens mais recentes no campo da terapêutica *ex vivo* com células dendríticas tem sido a transfeção de células dendríticas autólogas derivadas de monócitos com o mRNA total do tumor amplificado de cada doente presumivelmente incluindo todos os antígenos tumorais relevantes, expressos e ativados por meio de co-transfeção com o mRNA que codifica para CD40L. Trata-se de uma vacina imunoterapêutica autóloga desenvolvida pela Empresa *Argos Therapeutics – RocapuldenceI-T* (AGS – 003). Esta vacina mostrou resultados muito promissores no carcinoma das células renais (CCR) de estadio IV e em estudos de fase 2 quando combinado com sunitinib¹⁰³. Esta mesma vacina (com a mesma formulação) foi posteriormente estudada através de um estudo de fase 3 multicêntrico como terapêutica de primeira linha no tratamento de doentes com CCR metastático. Com este estudo não foi possível aumentar a sobrevivência generalizada da população estudada nem mesmo em doentes que foram submetidos a uma terapêutica combinada. No entanto, foram identificados dois potenciais marcadores capazes de prever a sobrevivência dos doentes que recebem imunoterapia com células dendríticas: IL-12, produzida pela própria vacina, e o número de linfócitos T reguladores presentes no sangue periférico dos doentes com CCR avançado¹⁰⁴.

De facto, ao longo dos últimos anos foram realizados vários ensaios clínicos com vacinas de células dendríticas direcionadas para diversos tipos de cancro, como o cancro da próstata metastático, cancro do pulmão metastático, carcinoma das células renais, cancro do

cérebro, melanoma, leucemia mieloide aguda, cancro do pâncreas, entre outros^{105,106,107} já descritos na literatura científica^{29,108}.

Em resumo, as terapias celulares personalizadas são complexas e dispendiosas, tendo sido evidentes os esforços no sentido de adaptar as moléculas de mRNA de modo a poderem ser utilizadas sem haver necessidade de transfectar células do sistema imunitário *ex vivo*.

4.1.2. Imuno-oncologia Intratumoral

A via de administração e a forma como a vacina de mRNA é entregue são dois fatores que influenciam bastante os resultados terapêuticos. Foram desenvolvidos uma série de formatos de vacinas de mRNA contra o cancro usando tanto vias de administração mais comuns – i.d., i.m., s.c. e intranasal – como vias de administração menos convencionais – i.nod., i.v., intraplênica e intratumoral (IT). A via IT é particularmente interessante uma vez que evita algumas das barreiras biológicas que mais influenciam a chegada destas moléculas terapêuticas ao local de ação. Para além disso, uma vez que as moléculas de mRNA têm a capacidade de ativar o sistema imune localmente – imunomodulação – é possível modificar o ambiente do tecido tumoral e, portanto, atacar diretamente as células cancerígenas. De facto, a vacinação IT de moléculas de mRNA demonstrou-se bastante útil uma vez que permite a ativação rápida e específica dos linfócitos T residentes nos tumores. Para além de modular o sistema imunitário induzindo-o a atacar o tumor, a tecnologia de mRNA permite também atuar localmente, uma vez que muitos tumores sólidos possuem microambientes imunitários desequilibrados.

Normalmente, estas vacinas não introduzem, no meio tumoral, mRNAs que codificam AAT, mas sim moléculas de mRNA imunoestimuladoras que visam ativar a imunidade específica *in situ* do tumor. Uma vez que a administração sistémica de moléculas imunomoduladoras induz respostas autoimunes, é de esperar que a administração de “pró-fármacos” de mRNA que expressem moléculas imunoestimuladoras não secretadas se mostre vantajosa. Idealmente, os pró-fármacos de mRNA e os seus veículos de entrega possuiriam propriedades imunogénicas intrínsecas mínimas ao mesmo tempo que transmitiriam imunogenicidade específica através da indução de AATs ou moléculas imunomoduladoras¹⁰⁹. Com efeito, a administração IT de mRNA apresenta maior eficácia em comparação com outras vias de administração uma vez que leva à produção local de proteínas específicas com a capacidade de restaurar uma resposta imunitária eficiente contra as células tumorais. Para além disso, mostrou-se igualmente capaz de inibir o crescimento tumoral em locais distantes do local de administração¹⁰⁹.

Um dos primeiros estudos nesta área demonstrou a capacidade imunogénica intrínseca das moléculas de mRNA tanto isoladas como estabilizadas com protamina, ambas a codificar um gene não relacionado com o tumor (GLBI). As duas preparações dificultaram o crescimento do tumor e induziram atividade anti-tumoral de longa duração num modelo animal (murganho) de glioblastoma⁴⁰. Um estudo mais recente mostrou que a entrega IT de mRNA que codifica para uma proteína de fusão que inclui uma citocina desenvolvida com base no $INF\beta$ fundido com um antagonista do *Transforming Growth Factor- β* ($TGF\beta$) aumentou a capacidade citotóxica dos linfócitos T $CD8^+$ e atrasou modestamente o crescimento de tumores que expressam OVA em modelos animais (murganhos) de linfoma¹¹⁰. Foi igualmente demonstrado que a administração IT de TriMix mRNA, que não codifica AATs (adjuvante), provocou a ativação de células dendríticas $CD8\alpha^+$ assim como de linfócitos T com atividade específica para o tumor, provocando um atraso no crescimento tumoral em vários modelos animais¹¹¹.

Paralelamente, as novas terapias imunomoduladoras mudaram por completo o paradigma do tratamento do cancro. Os CPI administrados por via sistémica melhoraram bastante a sobrevivência de doentes com cancros metastáticos uma vez que inibem os mecanismos co-inibitórios CTLA-4 e PD1/PD-L1 dos linfócitos T¹¹². Estes anticorpos permitem obter resultados duradouros quando aplicados na clínica, no entanto, muitos tumores são resistentes aos inibidores de *checkpoint* imunológicos. Uma formulação desenvolvida pela indústria farmacêutica *Moderna Therapeutics* (EUA) veio tentar colmatar este problema. Esta indústria utilizou moléculas de mRNA que codificam para IL-23, IL-36 γ e OX40L – citocinas que se mostraram eficientes no tratamento de tumores sólidos - e estudou a sua ação, isoladamente, após administração intratumoral, em modelos animais. Foi verificando que estas moléculas produzem uma resposta antitumoral robusta num leque alargado de microambientes tumorais. É de salientar que, neste estudo, foram utilizados modelos animais de adenocarcinoma do colon e carcinoma hepatocelular. Foi igualmente estudada uma nova formulação que combina estas três citocinas (tripleto IL-23/IL-36 γ /OX40L) que desencadeou uma resposta antitumoral mais pronunciada em comparação com a administração das citocinas isoladamente. Os tratamentos com estas combinações de moléculas de mRNA não só induziram a expressão de citocinas e quimiocinas no meio IT, como também permitiram a ativação de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T. Verificou-se, portanto, uma mobilização substancial de células imunitárias para o local do tumor permitindo uma destruição eficaz da massa tumoral. Para além disso, a combinação deste tripleto de mRNA com imunoterapia sistémica CPI mostrou-se vantajosa uma vez que foi eficaz em modelos resistentes à imunoterapia convencional isolada. Estudos posteriores

em células humanas mostraram, também, uma possível transposição da ação moduladora para doentes humanos¹¹³.

A Formulação TriMix, referida anteriormente, está, também, a ser adaptada para administração IT num ensaio clínico de fase I direcionado para o tratamento do cancro da mama em estado inicial¹¹⁴.

A indústria farmacêutica *BioNtech* tem, de momento, um ensaio clínico de Fase I em curso com uma injeção IT de mRNA (SAR441000) que codifica para citocinas com potencial imuno-modulador e atividade antineoplásica, nomeadamente a interleucina-12sc (IL-12sc), interleucina-15sushi (IL-15sushi), INF α e fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Todas estas citocinas foram administradas em doentes com tumores sólidos. Foi provado que o aumento destas citocinas no microambiente tumoral facilita o reconhecimento e favorece o combate das células cancerígenas pelo sistema imune, uma vez que induz a atividade citotóxica dos linfócitos T¹¹⁵.

Em 2018, foi descrita uma estratégia de vacinação com mRNA contra o cancro usando *charge-altering releasable transportes*, conhecidos por CARTs¹¹⁶ onde foi possível curar murganhos com grandes tumores conhecidos. Para além disso, este trabalho mostrou que os próprios CARTs possuem baixa imunogenicidade intrínseca e que, através da incorporação de adjuvantes ao seu complexo de moléculas de mRNA é possível induzir uma modulação personalizada das respostas imunes. Este estudo levou, mais tarde, a um novo estudo pré-clínico que permitiu demonstrar que a administração de moléculas de mRNA que codificam para OX40L, CD80 e CD86 administradas no interior de CART no meio IT, resulta na expressão do mRNA de interesse no local de administração e na transfeção substancial de células dendríticas, macrófagos e linfócitos T, para além das células tumorais, induzindo, portanto, um efeito anti-tumoral local¹⁰⁹. Esta formulação provocou um atraso no crescimento tumoral, facilitou a regressão do tumor e curou tumores em dois modelos tumorais – linfoma A20 subcutâneo de linfócitos B e carcinoma do colon CT26. Neste segundo estudo, foram estudadas várias formulações de mRNAs que codificavam diferentes moléculas imunomoduladoras (testadas individualmente e em combinação) permitindo chegar à conclusão que a formulação que combina OX40L e CD80/CD86 mRNAs-CART para além de provocar um aumento de citocinas pro-inflamatórias localmente e permitir uma ativação robusta de linfócitos T – linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células NK – induziu a expressão positiva de marcadores de ativação (CD137, CD69, Cd357 e CD25), de marcadores de citotoxicidade (como a perforina e granzima B) e do marcador de proliferação Ki-67. Para além disso, induziu a migração de células para o nódulo linfático de drenagem local e para tumores distantes não tratados. De facto, a injeção IT destes complexos CART-mRNA, para além de induzir

respostas antitumorais locais, tem a capacidade de provocar um efeito sistêmico exercendo atividade adicional noutros tumores espalhados pelo corpo demonstrando, portanto, uma possível atuação em metástases. Efetivamente, com a administração de mRNA-CART CD80/86, OX40L e IL-12 foi observado um atraso significativo no crescimento de um tumor distal não tratado, resultando numa imunidade global anti-tumoral. Curiosamente, a terapêutica *in situ* com a combinação de OX40L e CD80/86 induziu uma resposta anti-tumoral específica restrita a tumores relacionados, isto é, a imunidade antitumoral provocada pelo tratamento local é específica para o fenótipo do tumor injetado. Posto isto, podemos concluir que a imunomodulação não parece incitar imunomodulação sistêmica inespecífica, mas sim uma resposta imune local focalizada que leva à imunidade sistêmica específica para o tumor inoculado. Do ponto de vista da segurança, o tratamento local com mRNA-CART de OX40L, CD80 e CD86 (combinação mais imunogénica), pareceu induzir uma resposta potente inflamatória altamente localizada, sem sinais de reações adversas sistêmicas. Do ponto de vista tecnológico, parte do sucesso desta formulação deve-se ao veículo de transporte utilizado – CART – uma vez que demonstrou uma ação extremamente local, transfetando apenas células no tumor inoculado. Este estudo foi a primeira referência de uma intervenção imunostimuladora baseada em moléculas de mRNA mediada por nanopartículas injetadas diretamente no microambiente tumoral. Com isto podemos verificar que os CARTs representam um novo e único veículo de terapia génica local concluindo que a entrega IT mediada por CART de moléculas imunostimuladoras codificadas por mRNA se trata de uma estratégia rápida, segura, versátil, robusta e flexível na indução de respostas antitumorais específicas contra uma variedade de tipos de tumores sólidos. É importante realçar que as moléculas imunostimuladoras utilizadas neste estudo fazem parte de um conjunto muito mais alargado de moléculas disponíveis. Face ao exposto, tanto o método de entrega de mRNA *in situ* escolhido como o conjunto de moléculas imunomoduladoras disponíveis, incluindo a possibilidade de complexação de vários genes, representa uma estratégia sólida para reverter terapêuticamente a imunossupressão antitumoral e provocar respostas imunes antitumorais com potencial curativo¹⁰⁹.

De um modo geral, todas as estratégias descritas apresentam um grande potencial a serem aplicadas em terapia personalizada contra uma variedade de tumores, seja em monoterapia ou em combinação com tratamentos já existentes. Não obstante de todas as vantagens inerentes a esta nova estratégia terapêutica, ainda há muito a melhorar neste campo. Para além da toxicidade associada a alguns sistemas de entrega de fármacos e da administração ficar comprometida devido tanto ao volume, bem como à localização do tumor, ainda não é clara a aplicabilidade da terapêutica imuno-oncológica IT em todos os tipos de tumores

sólidos. De facto, há um futuro promissor para esta terapêutica antitumoral e, por conseguinte, de momento, toda a investigação neste campo concentra-se essencialmente na busca de proteínas que possam ser expressas localmente e que terão uma possível ação terapêutica benéfica.

4.1.3. Vacinas de mRNA Personalizadas para o Cancro

O objetivo primordial das vacinas para o cancro é aumentar as propriedades antigénicas das proteínas de modo a ajudar o doente a ativar mais facilmente uma resposta imune contra as suas próprias células cancerígenas. As moléculas de mRNA usadas são desenhadas em laboratório para codificarem essencialmente AETs ou AATs. Estes antigénios são posteriormente reconhecidos pelo corpo e eliminados pelo sistema imune. De certo modo, pretende-se aumentar a sensibilidade do sistema imune do doente contra o seu próprio tumor.

Os avanços na capacidade de identificação de neoantigénios característicos do cancro como produtos de mutações *missense* tem sido a área mais promissora dentro do campo das vacinas contra o cancro⁷⁹. Se antigénicas, essas sequências seriam únicas para o tumor e não provocariam uma resposta cruzada com o tecido normal.

Primeiramente, os AET podem ser identificados por sequenciamento de amostras de biópsias do tumor. Posteriormente, é avaliada e classificada a sua possível afinidade às moléculas MHC de classe I e MHC de classe II tendo como base parâmetros bioinformáticos probabilísticos de acoplamento. A tecnologia utilizada para identificar estes antigénios baseia-se na comparação de sequências do exoma completo do tecido tumoral com sequências de tecido normal. Assim, utilizando algoritmos bioinformáticos preditivos, que, apesar de muito úteis, são ainda muito incompletos, é possível identificar os antigénios candidatos com base em estimativas da sua afinidade para com alelos do MHC, níveis de expressão tumoral, entre outras características¹¹⁷. De seguida, é formulado um mRNA personalizado que contém vários dos principais neoantigénios que apresentaram maior probabilidade de gerar uma resposta ótima das células T contra o cancro (Figura 3). Esta abordagem revelou capacidade de induzir imunogenicidade tanto mediada por linfócitos T CD8⁺ como por linfócitos T CD4⁺, sendo esta resposta mais pronunciada quando as moléculas de mRNA são formuladas em lipossomas levemente aniónicos ou mesmo neutros, administrados por via i.v.¹¹⁸.

As indústrias farmacêuticas *BioNTech* e a *Moderna Therapeutics* estão a explorar o potencial das vacinas personalizadas para o cancro usando moléculas de mRNA tanto entregues numa solução tampão (mRNA livre), como usando formulações com lipoplexos ou NPL. A

complexidade destas últimas misturas lipídicas permite otimizar a entrega *in vivo* mostrando-se bastante imunogénicas em murganhos³⁰.

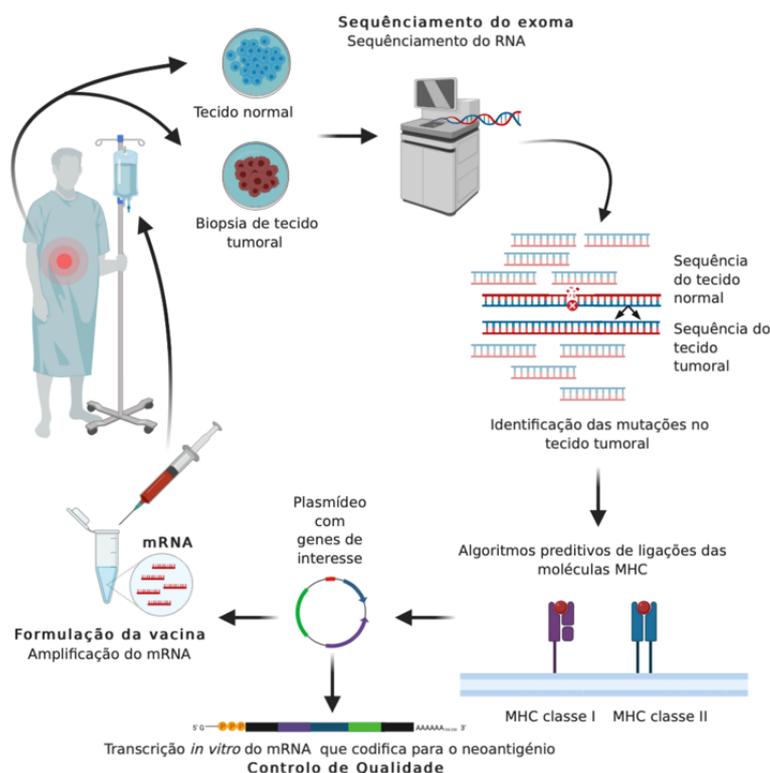


Figura 3: Processo de produção das vacinas antitumorais personalizadas à base de mRNA.

O perfil de exões de células tumorais isoladas de uma biópsia é comparado com o de células normais de modo a identificar mutações específicas do tumor. Diferentes mutações podem levar à origem de neoantígenos como mutações pontuais não-sinónimas, deleções ou rearranjos de genes. Posteriormente, é prevista a ligação dos neoantígenos aos recetores MHC de classe I e II (necessário para o reconhecimento pelos linfócitos T) com a ajuda de várias ferramentas bioinformáticas. É igualmente avaliada a expressão do RNA do antígeno mutado entre as células tumorais (controlo de qualidade do nucleótido produzido). O sequenciamento do RNA permite verificar qual o gene que codifica o neoantígeno que é realmente expresso pelas células tumorais. Os genes que codificam para os neoantígenos de interesse são inseridos num plasmídeo, replicados e retrotranscritos em mRNA. Finalmente, as moléculas de mRNA produzidas, carregadas negativamente, são injetadas na sua forma livre, associadas a um veículo de entrega carregado positivamente como NPLs ou inoculadas em células dendríticas. (Adaptado de Pastor *et al.*, 2018)

A indústria biotecnológica *Moderna Therapeutics*, em conjunto com a *Merck Sharp & Dohme* começou um ensaio clínico de fase I com o objetivo de avaliar a segurança, tolerabilidade e imunogenicidade de vacinas personalizadas para o cancro administradas isoladamente ou em associação com pembrolizumab (um mAb anti-PD-1) em indivíduos com tumores sólidos¹¹⁹. Mais recentemente, foi iniciado um ensaio clínico de fase 2 com a mesma molécula de mRNA (mRNA-4157) com o objetivo de avaliar se, em doentes com resseção completa de melanoma cutâneo e com alto risco de recidiva, a terapêutica pós-operatória com este mRNA em associação com pembrolizumab aumenta o tempo livre de doença em comparação com o pembrolizumab isolado¹²⁰.

As indústrias *BioNTech* e *Roche-Genentech* também iniciaram um ensaio clínico em 2017 para uma vacina personalizada de mRNA em lipossomas combinada com atezolizumab (um mAb anti-PD-L1)¹²¹. Dois anos mais tarde iniciaram um novo ensaio clínico (fase 2) com a mesma formulação com o objetivo de melhor estudar a eficácia, segurança, farmacocinética e resultados da mesma em doentes com melanoma avançado (não tratado anteriormente). Neste estudo será, igualmente, feita a comparação entre a terapêutica com esta formulação associada com pembrolizumab com o pembrolizumab isolado¹²².

Ainda que a seleção e *targeting* de neoepítomos utilizando mRNA no desenvolvimento de vacinas personalizadas tenha demonstrado uma alta imunogenicidade e sinais de eficácia clínica em tumores como o melanoma – um tipo de tumor com muitas e variadas mutações – apenas uma minoria dessas mutações podem ser processadas e apresentadas pelo sistema HLA permitindo o direcionamento dos linfócitos T²⁷. Em cancros com poucas mutações é possível que isto seja uma limitação na utilização de imunoterapias contra antígenos específicos como a utilização de CPIs, uma vez que é muito comum que os tumores não possuam variedade suficiente de neoepítomos alvo para o sistema HLA¹²³. Por outro lado, ainda que o tempo de produção destas vacinas, incluindo a previsão de epítomos, síntese e controlo de qualidade, possa ser otimizado, um período de 6-7 semanas é ainda demasiado longo. O tempo de produção é, sem dúvida, um fator chave para a utilização das vacinas personalizadas para o cancro visto que o tempo útil de espera pode ser limitado em pacientes com cancros de estadió avançado¹²⁴.

4.1.4. Vacinas de mRNA que Codificam Anticorpos

As terapêuticas recombinantes com mAbs, largamente utilizadas na prática clínica, enfrentam algumas limitações relacionados com a sua produção, incluindo o facto de requererem processos de fabrico complexos que levam à presença de várias impurezas intrínsecas, variações no produto final, baixa estabilidade durante o armazenamento a longo prazo e tendência a agregação ao longo do tempo¹²⁵. Acresce ainda o facto de os próprios anticorpos serem suscetíveis a uma rápida clearance e degradação acentuada por enzimas presentes em circulação. Em especial, os anticorpos biespecíficos têm um tempo de semivida em circulação muito curto (de apenas algumas horas) sendo necessária uma bomba de infusão para permitir a sua administração contínua aos doentes¹²⁶. A utilização de moléculas de mRNA que codificam para estes anticorpos permitiu a sua produção diretamente no doente representando, por isso, uma abordagem promissora para superar algumas das limitações enunciadas.

Num estudo recente Stadler et al.¹²⁷ demonstrou que, através da incorporação de nucleósidos modificados de mRNA transcritos *in vitro* (TIV) que codificam um ativador dos linfócitos T biespecífico direcionado a três AATs – *tight-junction proteins claudin 6* (CLDN6), *claudin 18.2* (CLDN18.2) e *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) – em células denominadas RiboMABs. A baixas doses (picomolar), as RiboMABs foram capazes de induzir a lise específica de células alvo com uma potência comparável com aquela atingida pela proteína recombinante correspondente. Para além disso, a expressão das moléculas de mRNA manteve-se durante vários dias, uma vez que o BsAb permaneceu ainda mensurável 72 horas após a sua administração. Trata-se de uma grande vantagem relativamente à terapêutica recombinante correspondente (CD3 x CLDN6) que possui um tempo de semivida em circulação extremamente baixo, uma vez que, após a sua administração, a sua concentração baixou abruptamente após 6 horas, sendo praticamente indetetável transcorridas apenas 24 horas. Refira-se ainda que, através de um ensaio de toxicidade *ex vivo* foi possível demonstrar a capacidade do plasma de murganhos, tratados com as moléculas de mRNA, de induzirem a lise específica de células alvo que expressam o AAT CLDN6. A lise máxima obtida foi de 90%, atingida 6 horas após o tratamento e manteve-se acima do nível médio-máximo por mais de 6 dias. De uma forma contrastante, a atividade citotóxica do plasma derivado de murganhos que receberam a terapia com a proteína recombinante caiu rapidamente para os níveis mínimos após 24 horas. A avaliação da segurança das RiboMAB mRNA num enxerto de PBMCs humanas em murganho NSG, para além de não revelar toxicidade hepática, não provocou a libertação sistémica de citocinas pro-inflamatórias causada pela ativação inespecífica de linfócitos T¹²⁷.

Foi igualmente demonstrada, num outro estudo, a eficácia antitumoral de um anticorpo codificado por mRNA num modelo de linfoma das células B humanas¹²⁸. Foram desenvolvidas, em separado, duas moléculas de mRNA que codificam para as sequências das cadeias pesadas e leves do anticorpo IgG1 contra o antigénio CD20 – rituximab. Tal como no primeiro estudo, foi utilizada a tradução do mRNA TIV de anticorpos funcionais. Para demonstrar a eficácia *in vivo*, foram administradas células Raji B, uma linha celular de linfoma de células B humanas CD20 positivas, por via i.v., a murganhos NOD/SCID. De seguida, o mRNA formulado foi administrado por i.v. com o objetivo de obter uma expressão elevada no fígado⁴⁶. Mais tarde, verificou-se a regressão completa do tumor na maioria dos murganhos com uma dose de 50 μ g de mRNA-NPL rituximab e os murganhos tratados com uma dose de 10 μ g apresentaram crescimento tumoral bastante reduzido.

Num estudo mais recente foi pela primeira vez demonstrada a capacidade de um mAb humanizado completo, produzido no fígado e entregue utilizando NPL carregadas com TIV-

mRNA, inibir o crescimento de tumores sólidos¹²⁹. Para tal, foi desenvolvido um veículo de entrega *in vivo* de TIV-mRNA associado a NPL (cKK-EI2 também conhecidas como MD-1) de um anticorpo anti-fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2 ou ERBB2) – trastuzumab. O trastuzumab trata-se de um medicamento utilizado no tratamento do cancro da mama à base de anticorpos que possuem como alvo o HER2, uma vez que este fator é sobreexpresso em aproximadamente 30% dos doentes com este tipo de cancro. Neste estudo foi comprovado que a utilização de TIV-mRNA NPLs que expressam o anticorpo terapêutico completo trastuzumab no fígado, representa uma estratégia viável no tratamento de tumores sólidos. A farmacocinética desta preparação foi comparada com o tratamento padrão de tumores HER2 positivos (8mg/kg *herceptin*, 160µg por animal). De facto, a injeção com 2mg/kg (40µg por animal) de mRNA apresentou níveis séricos comparáveis à injeção da proteína clinicamente mais revelante apresentando níveis de expressão proteicos superiores aos apresentados em estudos publicados anteriormente^{127,128,130}. Efetivamente, 24 horas após a administração de 40µg de NPL-mRNA ou 160µg de proteína recombinante, a concentração sérica de trastuzumab produzido endogenamente é comparável com os níveis de anticorpo injetado. Verificou-se ainda que, contrariamente ao declínio contante dos níveis de trastuzumab em murganhos que receberam *herceptin*, os níveis de trastuzumab em murganhos injetados com NPL-mRNA teve uma expressão mais prolongada ao longo de 14 dias (permaneceu dentro de $45 \pm 8,6\mu\text{g/ml}$). Duas semanas após a injeção do mRNA, os níveis séricos do anticorpo produzido ainda estavam acima da concentração plasmática mínima terapêutica necessária para provocar efeitos anti-proliferativos. A sua atividade anticancerígena foi comprovada uma vez que uma administração i.v. semanal de 2mg/kg de NPLs de trastuzumab mRNA, durante 4 semanas, foi capaz de inibir o crescimento do cancro da mama em murganhos atímicos e melhorou a sobrevivência geral dos animais, superando, assim, o tratamento padrão com *herceptin*. É de realçar que esta inibição do crescimento tumoral foi específica para células tumorais que expressam o recetor HER2. Curiosamente, foi verificado que as NPLs utilizadas foram capazes de fornecer TIV-mRNA diretamente no tumor após administração por via i.v.. Esta expressão de anticorpos terapêuticos no microambiente tumoral ou diretamente nas células tumorais poderá, não só aumentar a eficácia terapêutica, mas também reduzir os efeitos *off-target*.

Efetivamente, todos os estudos evidenciam claramente que a expressão de anticorpos mediada por moléculas de mRNA pode ser aplicável à oncologia uma vez que traz vantagens em comparação com os produtos biológicos recombinantes que, frequentemente, apresentam um tempo de semivida plasmático bastante curto o que condiciona muito a eficácia da

terapêutica. Para além disto, a utilização de TIV-mRNAs, permite que haja uma produção *in vivo* do anticorpo, melhorando o controlo das modificações pós-translacionais¹³¹.

Posto isto, uma vez que estes anticorpos terapêuticos, produzidos endogenamente, apresentam um maior tempo de semivida em circulação, é possível reduzir a frequência de administração, dosagem e, subsequentemente, o custo geral do tratamento. Não obstante, são necessários mais estudos neste campo para ser possível avaliar a sua verdadeira potencialidade em imunoterapia. Com efeito, algumas indústrias farmacêuticas como a *BioNTech AG* e *CureVac AG* têm vindo a explorar a utilização de moléculas de mRNA que codificam anticorpos no tratamento do cancro.

5. Dinâmica *In Vivo*

Limitações bastante comuns da aplicação das moléculas de mRNA na terapêutica como a sua fraca estabilidade; dificuldade de passagem das barreiras biológicas; fraca internalização pelas células alvo; e toxicidade das formulações, podem ser consideradas os motores da inovação tecnológica neste setor.

5.1. Estabilidade

A estabilidade das moléculas de RNA deve ser altamente regulada de modo a obter uma produção controlada de proteínas. Alguns elementos estruturais como, por exemplo, sequências ricas em Adenil-uridilato (AU), aceleram a degradação do mRNA. Este padrão é bastante comum em sequências de mRNA que codificam proteínas que requerem expressão durante pouco tempo, como é o caso das citocinas^{132,133}. Outro fator que influencia a estabilidade das moléculas de mRNA é a presença de RNases no microambiente tumoral. De facto, a produção de RNases é um mecanismo de defesa adicional do sistema imune inato que permite evitar a replicação viral e a acumulação de RNAs aberrantes ou sem sentido¹³⁴. Efetivamente, terapêuticas à base de moléculas de mRNA que pretendam evitar a exposição às RNases, que é o caso das terapêuticas contra o cancro, deverão sofrer alterações químicas por forma a aumentar a sua estabilidade. Para tal, cada um dos seus componentes deverá ser otimizado. A *cap* é uma estrutura essencial que, como vimos anteriormente, não só protege o mRNA eucariota, mas também é indispensável para o processo de tradução. A *cap* pode ser inserida adicionando análogos da *cap* ou usando enzimas produtoras da *cap* que evitam que o mRNA sofra *decapping* durante o processo de transcrição^{135,136}. Para além disso, podem ser utilizados análogos *anti-reverse cap* durante a reação de *capping* de modo a evitar a inserção da *cap* na orientação errada, o que poderá levar à formação de um RNA que simplesmente não

pode ser transcrito numa proteína¹³⁷. É importante lembrar que as extremidades UTR 3' e 5' também são determinantes da estabilidade da molécula de mRNA e a sua estrutura também deve ser controlada.

Para além disso, as regiões codificantes das moléculas de mRNA podem ser obtidas e otimizadas utilizando algoritmos matemáticos especialmente desenvolvidos para este fim. Estes algoritmos permitem obter codões otimizados de acordo com a abundância de tRNA em cada espécie. Isto permite aumentar drasticamente a expressão das moléculas de RNA, uma vez que evitam a utilização de codões raros. Deste modo, é possível aumentar a eficácia da transcrição do RNA sem alterar a sequência de proteínas¹³⁸.

Por fim, as caudas poli-A podem ser igualmente otimizadas de modo a maximizar a expressão da proteína de interesse. Efetivamente, uma cauda com entre 120 e 150 aminoácidos é considerada ótima e a introdução de *N*¹-metil-pseudouridina permite, não só limitar a ativação dos recetores intrínsecos do RNA, mas também melhorando a eficácia na tradução aumentando o tempo de pausa dos ribossomas assim como a sua densidade no mRNA¹³⁹.

Apesar de todos os esforços no sentido de melhorar a estabilidade destas moléculas *in vivo*, algumas das imunoterapias baseadas em moléculas de mRNA ainda apresentam uma farmacocinética mais curta que outras terapêuticas com anticorpos e proteínas recombinantes. Na sua maioria passam menos tempo no local de ação e exigem uma maior frequência de reposição de doses.

5.2. Entrega Intracelular

Um dos principais desafios na entrega de fármacos à base de mRNA encontra-se em fazer passar grandes moléculas carregadas negativamente através da membrana celular. Uma vez que a difusão não é possível, estas moléculas são maioritariamente internalizadas por endocitose (Figura 3). Curiosamente, algumas células especializadas como as células dendríticas têm a capacidade de internalizar moléculas de RNA por macropinocitose^{31,140}.

Nas vacinas para o cancro à base de mRNA, a via i.d. é considerada a via de administração ideal uma vez que uma grande variedade de células apresentadoras de antígenos residem na pele¹⁴¹. Apesar de serem atingidos baixos níveis de expressão do mRNA por via i.d., é possível aumentar a expressão/inibição utilizando outros meios de administração. Por outro lado, a injeção sem agulha mostrou-se mais vantajosa que a injeção com agulha uma vez que permite uma disposição mais ampla do mRNA na pele levando a um aumento da sua

internalização pelas células do sistema imunitário e consequente expressão antigénica, aumentando, assim, a imunogenicidade global da fórmula¹⁴².

Como já foi referido, as NPLs são veículos de transporte de fármacos compostos por lípidos conjugados com PEG e lípidos catiónicos ionizáveis. Lípidos associados a PEG com cadeias acil curtas permitem aumentar o tempo de circulação e minimizar a agregação; estas podem, no entanto, resultar em estruturas mais imunogénicas. Efetivamente, o uso de nanopartículas biodegradáveis, lipossomas catiónicos, entre outros veículos não virais baseados em polímeros e lípidos tem sido intensivamente estudado na entrega de ácidos nucleicos *in vivo*. Estes sistemas apresentam uma variedade de benefícios, como menor imunogenicidade e toxicidade, a possibilidade de uma administração repetida e menores custos de produção. Naturalmente, estes veículos de entrega não são perfeitos e possuem algumas limitações devido à sua estabilidade em circulação, citotoxicidade e tamanho de partícula (são maiores que os vetores virais).

De facto, são vários os tipos de sistemas utilizados na entrega de ácidos nucleicos como os lipossomas, NPL, lipoplexos, nanoemulsões catiónicas e poliplexos. Estes últimos são considerados uma boa alternativa aos lipossomas e às NPLs na entrega de mRNA *in vivo*. Foi demonstrado que os poliplexos conferem alta proteção às moléculas de mRNA contra ribonucleases e interações *in vivo* indesejadas com *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TLRs)¹⁴³. Para além disso, a expressão da molécula de interesse foi maior, em comparação com os resultados após administração de mRNA na forma livre.

Muitos destes sistemas já são utilizados em moléculas de RNA nomeadamente siRNAs e microRNAs, no entanto, a sua utilização em mRNA ainda não foi bem estudada. Mais recentemente, foram desenvolvidas vacinas de mRNA para o cancro usando CARTs que permitiram curar tumores em murganhos^{144,145,146}. Este veículo foi recentemente utilizado num ensaio pré-clínico, numa terapêutica IT com moléculas de mRNA que codificam moléculas imunomoduladora¹⁰⁹. Verificou-se que as CART permitem a transfeção eficiente de múltiplos subconjuntos de células imunomoduladoras dentro do microambiente tumoral, induzindo uma ação extremamente localizada e específica, uma vez que, apenas foram transfetadas células do tumor inoculado. De facto, nenhum sinal foi detetado em células tumorais distantes do local de administração ou em qualquer outro órgão. Posto isto, podemos concluir que este sistema se trata de um meio apropriado de entrega e expressão *in situ* de moléculas terapêuticas codificadas por mRNA.

No campo da tecnologia farmacêutica tem-se também investido fortemente na pesquisa de formas de melhorar a disrupção endossomal após a internalização do mRNA pela célula alvo com o objetivo de promover a sua libertação de forma mais eficiente no meio

intracelular evitando a sua alteração e/ou degradação. Para tal, têm-se estudado novos lípidos e polímeros com a capacidade de mascarar os ácidos nucleicos. Por outro lado, há interesse em otimizar a biodistribuição destes complexos farmacológicos, aumentando a especificidade das NPLs, promovendo uma entrega direcionada através do uso de modificações estruturais na sua superfície como, por exemplo, incorporação de mAbs, aptâmeros de RNA entre outros elementos.

5.3. Toxicidade

Um terceiro grande obstáculo no desenvolvimento de medicamento à base de RNA tem sido a sua toxicidade. As duas reações adversas comuns mais descritas são o desenvolvimento de reações de infusão e a indução de uma resposta pro-inflamatória. De forma a aumentar a segurança destas formulações é fundamental ter em conta tanto a estrutura da molécula de mRNA como a do próprio veículo de entrega. Note-se que preparações com nucleótidos modificados altamente purificadas de mRNA podem afetar o seu reconhecimento pelos recetores de RNA e, por conseguinte, melhorar a tolerância da formulação. O veículo de entrega pode igualmente contribuir para o surgimento de reações de infusão e indução de uma resposta pro-inflamatória positiva. Entre as demais problemáticas podemos incluir o potencial tóxico dos componentes das NPLs, incluindo os lípidos catiónicos, fosfolípidos ou a combinação entre ambos^{41,147}. Outros componentes das NPLs, como o PEG, que são utilizados para aumentar o tempo de semivida plasmático da formulação, são altamente imunogénicos. Estes podem, por exemplo, provocar a produção de anticorpos da imunoglobulina M (IgM) que, por sua vez, provocam a opsonização destas partículas pelos macrófagos¹⁴⁸. Para além disso, embora administrados localmente, alguns veículos de entrega tendem, ainda assim, a acumular-se em órgãos distantes do local de administração, incluindo o fígado, o que pode induzir efeitos adversos indesejados.

Na tentativa de solucionar alguns dos problemas relacionados com as formulações com NPLs, a proporção dos seus diferentes componentes tem vindo a ser estudada com vista a desenvolver uma formulação que permita diminuir a sua imonogenicidade global. Contrariamente às NPLs, os CART, para além de serem altamente específicas para o tecido injetado, degradam-se em subprodutos neutros¹⁴⁴, sendo, por isso, um veículo de entrega de mRNA bastante atraente em imunoterapia IT.

Por outro lado, alguns sistemas de entrega de fármacos sensíveis a estímulos são capazes de melhorar a eficiência na entrega de genes ao mesmo tempo que reduzir a citotoxicidade e outros efeitos secundários. Estes sistemas permitem ainda a co-entrega de

medicamentos quimioterapêuticos com genes ou oncogenes relacionados com a tolerância a um determinado medicamento, fornecendo, assim, uma base teórica melhorada para a terapia génica na terapêutica anticancerígena⁴⁸.

6. Perspetivas Futuras e Notas Conclusivas

Atualmente, as moléculas de mRNA têm tido uma atenção especial pela comunidade científica e, nos últimos anos, veio a verificar-se um elevado número de novos estudos e ensaios clínicos utilizando esta terapia génica. Efetivamente, estas moléculas são bastante versáteis sendo, portanto, diversas as áreas onde esta tecnologia poderá ser aplicada.

Apesar da sua utilização ter começado na área das vacinas profiláticas, atualmente verifica-se uma expansão para o campo do tratamento imuno-oncológico com o desenvolvimento das vacinas para o cancro e das técnicas de imuno-oncologia IT. Tem sido igualmente relevante a aplicação destas moléculas no campo da medicina regenerativa e terapia de substituição. Efetivamente, com a ajuda desta ferramenta de edição génica somos cada vez mais capazes de promover uma terapêutica adequada às características específicas de cada doente, tornando-a mais personalizada. Ainda assim, uma vez que a utilização de moléculas de mRNA na terapêutica é bastante recente, será, sem dúvida, necessária uma investigação mais profunda no que diz respeito à sua segurança e eficácia, não só em humanos, mas também em diferentes espécies animais.

De momento, a imunoterapia no tratamento do cancro ainda se encontra dominada por anticorpos, proteínas recombinantes, células T modificadas e pequenas moléculas, porém, há muito potencial de melhoria na sua eficácia. Cada vez mais resultados clínicos têm demonstrado que as terapias e vacinas baseadas em RNA e, em especial mRNA, trazem vantagens no tratamento de inúmeras patologias aumentando, assim, o interesse da comunidade científica nestas abordagens terapêuticas alternativas que, para além de eficácia, trazem vantagens farmacocinéticas, económicas e regulamentares. Posto isto, tanto estudos pré-clínicos como clínicos são imperativos na avaliação do comportamento dos diferentes componentes que constituem o fármaco à base de mRNA, aquando da sua administração. Supletivamente, estes estudos permitirão não só avaliar a possibilidade de desenvolvimento das mais diversas reações adversas (toxicidade intrínseca), mas também, em particular na terapêutica oncológica, ajudarão a descobrir quais as vias de sinalização imunológica mais eficazes em humanos. A crescente compreensão dos mecanismos imunomoduladores operacionais dos tumores, tem permitido a implementação de estratégias imunoterapêuticas inovadoras cada vez mais eficazes no tratamento do cancro.

Para dar resposta a estes avanços, são necessárias ferramentas mais precisas e eficientes que facilitem a utilização terapêutica das novas descobertas. Assim sendo, é altíssima a demanda por plataformas terapêuticas mais versáteis capazes de combinar múltiplos fármacos e de exercer a sua ação em diferentes alvos, com mínima toxicidade. Por outro lado, apesar da injeção local poder ajudar a ultrapassar o potencial tóxico associado à administração sistémica, ainda são poucas as estratégias de entrega de fármacos capazes de garantir uma entrega localizada e uma indução da sua ação de forma eficiente.

O rápido progresso da terapêutica com moléculas de mRNA, especialmente na área do cancro, não teria sido possível sem grandes avanços tanto na deteção da resposta imune inata desencadeada pelo RNA como dos métodos de entrega *in vivo*. Devido à extensa pesquisa básica sobre a estrutura e funcionalidade do RNA no tratamento do cancro e bioquímica de lípidos e polímeros no desenvolvimento de sistemas de entrega eficientes, foi possível a aplicação de moléculas de mRNA em ensaios clínicos o que levou a um nível surpreendente de investimento por parte de várias empresas na área da terapêutica oncológica com mRNA (Tabela 2). Grande parte dos estudos de utilização de mRNA na terapêutica têm sido levados a cabo essencialmente por indústrias farmacêuticas como a *Moderna Pharmaceuticals* (EUA), *BioNtech* (EUA), *CureVac* (Alemanha), *Acuitas Therapeutics* (EUA), *Arcturus Therapeutics* (EUA) entre outras, em parceria com inúmeras Universidades. A *Moderna Therapeutics*, empresa Norte Americana fundada em 2010, foi das empresas que mais tem investido na comercialização de vacinas e outras terapias baseadas em mRNA¹⁴⁹. Na Europa, nomeadamente na Alemanha, a *CureVac AG* tem um portefólio crescente de alvos terapêuticos¹⁵⁰ incluindo tanto em doenças infecciosas como no cancro. A *BioNTech* assim como a *Moderna Therapeutics* estão também a desenvolver uma abordagem inovadora na área da medicina personalizada contra o cancro utilizando vacinas de mRNA que codificam neoepítomos, descritas anteriormente (Tabela 3).

Tabela 3: Principais criadores de vacinas de mRNA: foco de pesquisa, parceiros e plataformas terapêuticas no campo da oncologia.

Instituições	Tecnologia de mRNA	Parceiros	Indicação Terapêutica (patologia)
<i>Durham Biotech Colmmune Inc.</i>	Neoantígenos de mRNA – plataforma Arcelis	ND	Vacinas Personalizadas para o Cancro
<i>BioNThech RNA Pharmaceuticals GmbH</i>	Nucleósidos Modificados de mRNA (IVAC Mutanome, iNeST, FixVAC) Anticorpos codificados por mRNA (RiboMabs)	Genentech/Roche	Vacinas Personalizadas para o Cancro
<i>Cure Vac AG</i>	Otimização de sequências, mRNA purificado (RNAActive®, RNArt, RNAdjuvant)	Boehringer Ingelheim GmbH	Vacinas para o Cancro (cancro do pulmão)
<i>eTheRNA Immunotherapies</i>	mRNA purificado (TriMix)	ND	Cancro (melanoma, mama)
<i>Moderna Therapeutics</i>	Nucleósidos Modificados de mRNA	Merck & Co.	Vacinas Personalizadas para o Cancro Imuno-oncologia Intratumoral

ND, não disponível

Em suma, podemos esperar um futuro brilhante na área da terapêutica com mRNA, em especial no campo da imuno-oncologia, dados os recursos clínicos fornecidos por estas empresas e outras instituições que provavelmente incrementarão a pesquisa básica sobre a possível aplicação desta terapêutica nas diversas áreas da ciência.

7. Referências

1. LIU, M. A. – **A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies.** *Vaccines*. 7:37 (2019) 1-20.
2. WARREN, L., LUIGI, M., AHFELDT, P. D., LOH, Y. H., LI, H., LAU, F., EBINA, W., MANDAL, P. K., SMITH, Z. D., MEISSNER, A., DALEY, G. Q., BRACK, A. S., COLLINS, J. J., COWAN, C., THORSTEN, T. M., ROSSI, D. J. – **Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA.** *Cell Stem Cell*. 7, 5 (2010) 618-630.
3. MAHINY, A. J., DEWERTH, A., MAYS, L. E., ALKHALED, M., MOTHERS, B., MALAEKSEFAT, E., LORETZ, B., ROTTENBERGER, J., BROSCHE, D.M., REAUTSCHNIG, P., SURAPOLCHAI, P., ZEYER, F., SCHAMS, A., CAREVIC, M., BAKELE, M., GRIESE, M., SCHWAB, M., NÜRNBERG, B., BEER-HAMMER, S., HANDGRETINGER, R., HARTL, D., LEHR, C., KORMANN, M. S. D. – **In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency.** *Nature Biotechnology*. 33 (2015), 584-586.
4. WALTER, G. – **The RNA world Superlattices point ahead.** *Nature*. 319 (1986) 618.
5. PEARCE, B. K. D., PUDRITZ, R. E., SEMENOV, D. A., HENNING, T. K. – **Origin of the RNA world: The fate of nucleobases in warm little ponds.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114:43 (2017) 11327-11332.
6. CLARK, D. P., PAZDERNIK, N. J. – **5. RNA-Based Technologies.** In: CLARK, D. P., PAZDERNIK, N. J. *Biotechnology – Applying the Genetic Revolution*, 2ª Edição. Illinois, USA: Elsevier, 2016, ISBN: 9780123850157, 131-179.
7. SAINSBURY, S., BERNECKY, C., CRAMER, P. – **Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16:3 (2015) 129-143.
8. KWAK H., LIS J.T. – **Control of Transcriptional Elongation.** *Annual Review of Genetics*. 47:1 (2013) 483-508.
9. JONKERS, I., LIS, J. T. – **Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16:3 (2015) 167-177.
10. RICHARD, P., MANLEY, J. L. – **Transcription termination by nuclear RNA polymerases.** *Genes and Development*. 23:11 (2009) 124-1269.
11. RAMANATHAN, A., ROBB, G. B., CHAN, S. H. – **mRNA capping: Biological**

- functions and applications.** *Nucleic Acids Research*. 44:16 (2016) 7511-7526.
12. GALEJ, W. P. – **Structural studies of the spliceosome: Past, present and future perspectives.** *Biochemical Society Transactions*. 46:6 (2018) 1407-1422.
 13. SHI, Y. – **Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18:11 (2017) 655-670.
 14. SONG, J., YI C. – **Chemical Modifications to RNA: A New Layer of Gene Expression Regulation.** *ACS Chemical Biology*. 12:2 (2017) 316-325.
 15. KARIKÓ, K., MURAMATSU, H., WELSH, F. A., LUDWIG, J., KATO, H., AKIRA, S., WEISSMAN, D. – **Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability.** *Molecular Therapy*. 16:11 (2008) 1833-1840.
 16. DAI, D., WANG, H., ZHU, L., JIN, H., WANG, X. – **N6-methyladenosine links RNA metabolism to cancer progression.** *Cell Death and Disease*. 9:2 (2018).
 17. IANNIELLO, Z., FATICA, A. – **N6-methyladenosine role in acute myeloid leukaemia.** *International Journal of Molecular Sciences*. 19:8 (2018).
 18. SHI, Z., BARNA, M. – **Translating the Genome in Time and Space: Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 31:1 (2015) 31-54.
 19. RITTIG, S. M., HAENTSCHEL, M., WEIMER, K. J., HEINE, A., MULLER, M. R., BRUGGER, W., HORGER, M. S., MAKSIMOVIC, O., STENZL, A., HOERR, I., RAMMENSEE, H., HOLDERRIED, T. A. W., KANZ, L., PASCOLO, S., BROSSART, P. – **Intradermal Vaccinations With RNA Coding for TAA Generate CD8 + and CD4 + Immune Responses and Induce Clinical Benefit in Vaccinated Patients.** *Molecular Therapy*. 19:5 (2009) 990-999.
 20. RICHNER, J. M., HIMANSU, S., DOWD, K. A., BUTLER, S. L., SALAZAR, V., FOX, J. M., JULANDER, J. G., TANG, W. W., SHRESTA, S., PIERSON, T. C., CIARAMELLA, G., DIAMOND, M. S. – **Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Article Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection.** *Cell*. 168:6 (2017) 1114-1125e10.
 21. DOENER, F., HONG, H. S., MEYER, I., TADJALLI-MEHR, K., DAEHLING, A., HEIDENREICH, R., KOCH, S. D., FOTIN-MLECZEK, M., GNAD-VOGT, U. – **RNA-based adjuvant CV8102 enhances the immunogenicity of a licensed rabies**

- vaccine in a first-in-human trial.** *Vaccine*. 37:13 (2019) 1819-1826.
22. JOHN, S., YUZHAKOV, O., WOODS, A., DETERLING, J., HASSETT, K., SHAW, C. A., CIARAMELLA, G. – **Multi-antigenic human cytomegalovirus mRNA vaccines that elicit potent humoral and cell-mediated immunity.** *Vaccine*. 36:12 (2018) 1689-1699.
23. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **Dose-Confirmation Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of mRNA-1273 COVID-19 Vaccine in Adults Aged 18 Years and Older** [NCT04405076]. [Consultado a 20 julho 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04405076?term=mRNA-1273&draw=2&rank=1>
24. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **A Study to Evaluate Efficacy, Safety, and Immunogenicity of mRNA-1273 Vaccine in Adults Aged 18 Years and Older to Prevent COVID-19** [NCT04470427]. [Consultado a 20 julho 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04470427?term=Moderna&cond=Covid19&draw=2&rank=1>
25. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **Study to Describe the Safety, Tolerability, Immunogenicity, and Efficacy of RNA Vaccine Candidates Against COVID-19 in Healthy Adults** [NCT04368728]. [Consultado a 10 agosto 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04368728?term=Biontech&cond=Covid-19&draw=2&rank=2>
26. LUTZ, J., LAZZARO, S., HABBEDDINE, M., SCHMIDT, K. E., BAUMHOF, P., MUI, B. L., TAM, Y. K., MADDEN, T. D., HOPE, M. J., HEIDENREICH, R., FOTIN-MLECZEK, M. – **Unmodified mRNA in LNPs constitutes a competitive technology for prophylactic vaccines.** *npj Vaccines*. 2:1 (2017) 1-9.
27. PROBST, J., WEIDE, B., SCHEEL, B., PICHLER, B. J., HOERR, I., RAMMENSEE, H-G, PASCOLO, S. – **Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent.** *Gene Therapy* 14 (2007) 1175-1180.
28. VAN LINT, S., GOYVAERTS, C., MAENHOUT, S., GOETHALS, L., DISY, A., BENTEYN, D., PEN, J., BONEHILL, A., HEIRMAN, C., BRECKPOT, K., THIELEMANS, K. – **Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy.** *Cancer Research*. 72:7 (2012) 1661-1671.

29. BENTEYN, D., HEIRMAN, C., BONEHILL, A., THIELEMANS, K., BRECKPOT, K. – **mRNA-based dendritic cell vaccines**. *Expert Review of Vaccines*. 14:2 (2014) 161-176.
30. KRANZ, L. M., DIKEN, M., HAAS, H., KREITER, S., LOQUAI, C., REUTER, K. C., MENG, M., FRITZ, D., VASCOTTO, F., HEFESHA, H., GRUNWITZ, C., VORMEHR, M., HÜSEMANN, Y., SELMI, A., HUHN, A. N., BUCK, J., DERHOVANESSIAN, E., RAE, R., ATTIG, S., DIEKMANN, J., JABULOWSKY, R. A., HEESCH, S., HASSEL, J., LANGGUTH, P., GRABBE, S., HUBER, C., TÜRECI, Ö., SAHIN, U. – **Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy**. *Nature*. 534:7607 (2016) 396-401.
31. SELMI, A., VASCOTTO, F., KAUTZ-NEU, K., TÜRECI, Ö., SAHIN, U., VON STEBUT, E., DIKEN, M., KREITER, S. – **Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice**. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 65:9 (2016) 1075-1083.
32. GEHL, J. – **Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research**. *Acta Physiologica Scandinavica*. 177:4 (2003) 437-447.
33. SAHIN, U., DERHOVANESSIAN, E., MILLER, M., KLOKE, B. P., SIMON, P., LÖWER, M., BUKUR, V., TADMOR, A. D., LUXEMBURGER, U., SCHRÖRS, B., OMOKOKO, T., VORMEHR, M., ALBRECHT, C., PARUZYNSKI, A., KUHN, A. N., BUCK, J., HEESCH, S., SCHREEB, K. H., MÜLLER, F., ORTSEIFER, I., VOGLER, I., GODEHARDT, E., ATTIG, S., RAE, R., BREITKREUZ, A., TOLLIVER, C., SUCHAN, M., MARTIC, G., HOHBERGER, A., SORN, P., DIEKMANN, J., CIESLA, J., WAKSMANN, O., BRÜCK, A. K., WITT, M., ZILLGEN, M., ROTHERMEL, A., KASEMANN, B., LANGER, D., BOLTE, S., DIKEN, M., KREITER, S., NEMECEK, R., GEBHARDT, C., GRABBE, S., HÖLLER, C., UTIKAL, J., HUBER, C., LOQUAI, C., TÜRECI, Ö. – **Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer**. *Nature*. 547:7662 (2017) 222-226.
34. BIALKOWSKI, L., VAN WEIJNEN, A., VAN DER JEUGHT, K., RENMANS, D., DASZKIEWICZ, L., HEIRMAN, C., STANGÉ, G., BRECKPOT, K., AERTS, J. L., THIELEMANS, K. – **Intralymphatic mRNA vaccine induces CD8 T-cell responses that inhibit the growth of mucosally located tumours**. *Scientific Reports*. 6:22509 (2016) 1-15.
35. NIMESH, S. – **I2 – Protamine Nanoparticles**. In: NIMESH, S.. *Gene Therapy – Potential*

- Applications of Nanotechnology. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013. 978-1907568-40-4, 237-258.
36. DUBES, G. R., WEGRZYN, R. J. – **Rapid Ephemeral Cell Sensitization as the Mechanism of Histone-Induced and Protamine-Induced Enhancement of Transfection by Poliovirus RNA.** *Protoplasma*. 96:3-4 (1978) 209-223.
 37. CHOI, Y-S., LEE, J. Y., SUH, J. S., KWON, Y-M., LEE, S-J., CHUNG, J-K., LEE, D-S., YANG, V. C., CHUNG, C-P., PARK, Y-J. – **The systemic delivery of siRNAs by a cell penetrating peptide, low molecular weight protamine.** *Biomaterials*. 31:6 (2010) 1429-1443.
 38. FONTIN-MLECZEK, M., DUCHARDT, K. M., LORENZ, C., PFEIFFER, R., OJKIĆ-ZRNA, S., PROBST, J., KALLEN, K-J. – **Messenger RNA-based Vaccines With Dual Activity Induce Balanced TLR-7 Dependent Adaptive Immune Responses and Provide Antitumor Activity.** *Journal of Immunotherapy*. 34:1 (2011) 1-15.
 39. RAUCH, S., LUTZ, J., KOWALCZYK, A., SCHLAKE, T., HEIDENREICH, R. – **RNA^{Active}® Technology: Generation and Testing of Stable and Immunogenic mRNA Vaccines.** In: Kramps T., Elbers K. (eds) *RNA Vaccines. Methods in Molecular Biology*, vol 1499. New York, NY: Humana Press, 2017. 978-1-4939-6481-9, 89-107.
 40. SCHEEL, B., AULWURM, S., PROBST, J., STITZ, L., HOERR, I., RAMMENSEE, H. G., WELLER, M., PASCOLO, S. – **Therapeutic Anti-tumor Immunity Triggered by Injections of Immunostimulating Single-stranded RNA.** *European Journal of Immunology*. 36:10 (2006) 2807-2816.
 41. REICHMUTH, A. M., OBERLI, M. A., JEKLENEC, A., LANGER, R., BLANKSCHTEIN, D. – **mRNA Vaccine Delivery Using Lipid Nanoparticles.** *Therapeutic Delivery*. 7:5 (2016) 319-334.
 42. GUAN, S., ROSENECKER, J. – **Nanotechnologies in Delivery of mRNA Therapeutics Using Nonviral Vector-based Delivery Systems.** *Gene Therapy*. 24:3 (2017) 133-143.
 43. KOWALSKI, P. S., RUDRA, A., MIAO, L., ANDERSON, D. G. – **Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery.** *Molecular Therapy*. 27:4 (2019) 710-728.
 44. GEALL, A. J., VERMA, A., OTTEN, G. R., SHAW, C. A., HEKELE, A., BANERJEE, K., CU, Y., BEARD, C. W., BRITO, L. A., KRUCKER, T., O'HAGAN, D. T., SINGH, M., MASON,

- P. W., VALIANTE, N. M., DOMITZER, P. R., BARNETT, S. W., RAPPUOLI, R., ULMER, J. B., MANDL, C. W. – **Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109:36 (2012) 14604-14609.
45. BLAKNEY, A. K., MCKAY, P. F., YUS, B. I., ALDON, Y., SHATTOCK, R. J. – **Inside out: optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and in vivo delivery of saRNA.** Gene Therapy. 26:9 (2019) 363-372.
46. PARDI, N., TUYISHIME, S., MURAMATSU, H., KARIKO, K., MUI, B. L., TAM, Y. K., MADDEN, T. D., HOPE, M. J., WEISSMAN, D. – **Expression Kinetics of Nucleoside-modified mRNA Delivered in Lipid Nanoparticles to Mice by Various Routes.** Journal of Controlled Release. 217 (2015) 345-351.
47. SAYERS, E. J., PEEL, S. E., SCHANTZ, A., ENGLAND, R. M., BEANO, M., BATES, S. M., DESAI, A. S., PURI, S., ASHFORD, M. B., JONES, A. T. – **Endocytic Profiling of Cancer Cell Models Reveals Critical Factors Influencing LNP-Mediated mRNA Delivery and Protein Expression.** Molecular Therapy. 27:11 (2019) 1950-1962.
48. ZHANG, L., ZHANG, L. – **Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Application.** Nano Life. 1:1&2 (2010) 163-173.
49. XIAO, Y., SHI, K., QU, Y., CHU, B., QIAN, Z. – **Engineering Nanoparticles for Targeted Delivery of Nucleic Acid Therapeutics in Tumor.** Molecular Therapy – Methods & Clinical Development. 12:3 (2019) 1-18.
50. ZHAO, W., ZHANG, C., LI, B., ZHANG, X., LUO, X., ZENG, C., LI, W., GAO, M., DONG, Y. – **Lipid Polymer Hybrid Nanomaterials for mRNA Delivery.** Cellular and Molecular Bioengineering. 11 (2018) 397-406.
51. LUI, Y., XU, C. F., IQBAL, S., YANG, X. Z., WANG, J. – **Responsive Nanocarriers as an Emerging Platform for Cascaded Delivery of Nucleic Acids to Cancer.** Advanced Drug Delivery Reviews. 115 (2017) 98-114.
52. YASAR, H., BIEHL, A., DE ROSSI, C., KOCH, M., MURGIA, X., LORETZ, B., LEHR, C. M. – **Kinetics of mRNA delivery and protein translation in dendritic cells using lipid-coated PLGA nanoparticle.** Journal of Nanobiotechnology. 16:1 (2018) 1-19.
53. SKOG, J., WÜRDINGER, T., VAN RIJN, S., MEIJER, D. H., GAINCHER, L., CURRY, W. T., CARTER, B. S., KRICHEVSKY, A. M., BREAKFIELD, X. O. – **Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and**

- provide diagnostic biomarkers.** *Nature Cell Biology.* 10:12 (2008) 1470-1476.
54. MITTELBRUNN, M., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., VILLARROYA-BELTRI, C., GONZÁLEZ, S., SÁNCHEZ-CABO, F., GONZÁLEZ, M. A., BERNAD, A., SÁNCHEZ-MADRID, F. – **Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells.** *Nature Communications.* 2:282 (2011) 1-10.
55. BAGLIO, S. R., ROOIJERS, K., KOPPERS-LALIC, D., VERWEIJ, F. J., PÉREZ LANZÓN, M., ZINI, N., NAAIKENS, B., PERUT, F., NIESSEN, H. W. M., BALDINI, N., PEGTEL, D. M. – **Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species.** *Stem Cell Research & Therapy.* 6:127 (2015) 1-20.
56. MATHIEU, M., MARTIN-JAULAR, L., LAVIEU, G., THÉRY, C. – **Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication.** *Nature Cell Biology.* 21:1 (2019) 9-17.
57. MIYANISHI, M., TADA, K., KOIKE, M., UCHIYAMA, Y., KITAMURA, T., NAGATA, S. – **Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor.** *Nature.* 450:7168 (2007) 435-439.
58. HURWITZ, S. N., MECKES, D. G. – **Extracellular Vesicle Integrins Distinguish Unique Cancers.** *Proteomes.* 7:2 (2019) 1-13.
59. KOOIJMANS, S. A. A., ALEZA, C. G., ROFFLER, S. R., VAN SOLINGER, W. W., VADER, P., SCHIFFELERS, R. M. – **Display of GPI-anchored anti-EGFR nanobodies on extracellular vesicles promotes tumour cell targeting.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 5:1 (2016).
60. ROYO, F., COSSÍO, U., RUIZ DE ÂNGULO, A., LLOP, J., FALCON-PEREZ, J. M. – **Modification of the glycosylation of extracellular vesicles alters their biodistribution in mice.** *Nanoscale.* 11:4 (2019) 1531-1537.
61. ZOBOROWSKI, M. P., CHEAH, P. S., ZHANG, X., BUSHKO, I., LEE, K., SAMMARCO, A., ZAPPULLI, V., MAAS, S. L. N., ALLEN, R. M., RUMDE, P., GVÖRGY, B., AUFIERO, M., SCHWEIGER, M. W., LAI, C. P. K., WEISSLEDER, R., LEE, H., VICKERS, K. C., TANNOUS, B. A., BREAKFIELD, X. O. – **Membrane-bound *Gussia luciferase* as a tool to track shedding of membrane proteins from the surface of extracellular vesicles.** *Scientific Reports.* 9:1 (2019) 1-16.
62. WIKLANDER, O. P. B., BRENNAN, M. Á., LÖTVALL, J., BREAKFIELD, X. O.,

- ANDALOUSSI, S. E. – **Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles.** Science Translational Medicine. 11:492 (2019) 1-16.
63. TKACH, M., KOWAL, J., ZUCCHETTI, A. E., ENSERINK, L., JOUVE, M., LANKAR, D., SAINTAKIS, M., MARTIN-JAULAR, L., THÉRY, C. – **Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes.** The EMBO Journal. 36:20 (2017) 3012-3028.
64. CHOI, D., LEE, T. H., SPINELLI, C., CHENNAKRISHNAIAH, S., D'ASTI, E., RAK, J. – **Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation.** Seminars in Cell and Developmental Biology. 67 (2017) 11-22.
65. ZHU, X., BADAWI, M., POMEROY, S., SUTARIA, D. S., XIE, Z., BAEK, A., JIANG, J., ELGAMAL, O. A., MO, X., PERLE, K. L., CHALMERS, J., SCHMITTGEN, T. D., PHELPS, M. A. – **Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells.** Journal of Extracellular Vesicles. 6:1 (2017).
66. SALEH, A. F., LÁZARO-IBÁÑEZ, E., FORSGARD, M. A. M., SHATNYEYA, O., OSTEIKOETXEA, X., KARLSSON, F., HEATH, N., INGELSTEN, M., ROSE, J., HARRIS, J., MAIRESSE, M., BATES, S. M., CLAUSEN, M., ETAL, D., LEONARD, E., FELLOWS, M. D., DEKKER, N., EDMUNDS, N. – **Extracellular Vesicles Induce Minimal Hepatotoxicity and Immunogenicity.** Nanoscale. 11:14 (2019) 6990-7001.
67. ZHANG, Q., HIGGINBOTHAM, J. N., JEPPESEN, D. K., YANG, Y. P., LI, W., MCKINLEY E. T., GRAVES-DEAL, R., PING, J., BRITAIN, C. M., DORSETT, K. A., HARTMAN, C. L., FORD, D. A., ALLEN, R. M., VICKERS, K. C., LIU, Q., FRANKLIN, J. L., BELLIS, S. L., COFFEY, R. J. – **Transfer of Functional Cargo in Exomeres.** Cell Reports. 27:3 (2019) 940-954.e6.
68. HEUSERMANN, W., HEAN, J., TROJER, D., STEIB, E., VON BUEREN, S., GRAFF-MEYER, A., GENOUD, C., MARTIN, K., PIZZATO, N., VOSHOL, J., MORRISSEY, D. V., ANDALOUSSI, S. E. L., WOOD, M. J., MEISNER-KOBER, N. C. – **Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER.** Journal of Cell Biology. 213:2 (2016) 173-184.
69. ESCUDIER, B., DORVAL, T., CHAPUT, N., ANDRÉ, F., CABY, M. P., NOVAULT, S., FLAMENT, C., LÉBOULAIRE, C., BORG, C., AMIGORENA, S., BOCCACCIO, C., BONNEROT, C., DHELLIN, O., MOVASSAGH, M., PIPERNO, S., ROBERT, C., SERRA,

- V., VALENTE, N., LE PECQ, J. B., SPATZ, A., LANTZ, O., TURSZ, T., ANGEVIN, E., ZITVOGEL, L. – **Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: Results of the first phase I clinical trial.** *Journal of Translational Medicine.* 3 (2005) 1-13.
70. VAN CRAENENBROECK, A. H., SMITS, E. L. J., ANGUILLE, S., VAN DE VELDE, A., STEIN, B., BRAECKMAN, T., VAN CAMP, K., NIJS, G., IEVE, M., GOOSSENS, H., BERNEMAN, Z. N., VAN TENDELOO, V. F. I., VERPOOTEN, G. A., VAN DAMME, P., COOLS, N. – **Induction of Cytomegalovirus-Specific T Cell Responses in Healthy Volunteers and Allogeneic Stem Cell Recipients Using Vaccination With Messenger RNA-Transfected Dendritic Cells.** *Transplantation.* 99:1 (2015) 120-127.
71. MARKOV, O., OSHCHEPKOVA, A., MIRONOVA, N. – **Immunotherapy based on dendritic cell-targeted/-derived extracellular vesicles – A novel strategy for enhancement of the anti-tumor immune response.** *Frontiers in Pharmacy.* 10:1 152 (2019).
72. SCHEEL, B., TEUFEL, R., PROBST, J., CARRALOT, J. P., GEGINAT, J., RADSAK, M., JARROSSAY, D., WAGNER, H., JUNG, G., RAMMENSEE, H. G., HOERR, I., PASCOLO, S. – **Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA.** *European Journal of Immunology.* 35:5 (2005) 1557-1566.
73. DE BEUCKELAER, A., GROOTEN, J., DE KOKER, S. – **Type I Interferons Modulate CD8+ T Cell Immunity to mRNA Vaccines.** *Trends in Molecular Medicine.* 23:3 (2017) 216-226.
74. KARIKÓ, K., BUCKSTEIN, M., NI, H., WEISSMAN, D. – **Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA.** *Immunity.* 23:2 (2005) 165-175.
75. KORMANN, M. S. D., HASENPUSCH, G., ANEJA, M. K., NICA, G., FLEMMER, A. W., HERBER-JONAT, S., HUPPMANN, M., MAYS, L. E., ILLENYI, M., SCHAMS, A., GRIESE, M., BITTMANN, I., HANDGRETINGER, R., HARTL, D., ROSENECKER, J., RUDOLPH, C. – **Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice.** *Nature Biotechnology.* 29:2 (2011) 154-159.
76. ANDRIES, O., MC CAFFERTY, S., DE SMEDT, S. C., WEISS, R., SANDERS, N. N., KITADA, T. – **NI-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression**

- and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice.** *Journal of Controlled Release.* 217 (2015) 337-344.
77. VIGNERON, N. – **Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy.** *BioMed Research International* (2015).
78. TÜRECI, Ö., VORMEHR, M., DIKEN, M., KREITER, S., HUBER, C., SAHIN, U. – **Targeting the Heterogeneity of Cancer with Individualized Neoepitope Vaccines.** *Clinical Cancer Research.* 22:8 (2016) 1885-1896.
79. MCNAMARA, M. A., NAIR, S. K., HOLL, E. K. – **RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy.** *Journal of Immunology Research* (2015).
80. TAGLIAMONTE, M., PETRIZZO, A., TORNESELLO, M. L., BUONAGURO, F. M., BUONAGURO, L. – **Antigen-specific vaccines for cancer treatment.** *Human Vaccines and Immunotherapeutics.* 10:11 (2014) 3332-3346.
81. WAGNER, S., MULLINS, C. S., LINNEBACHER, M. – **Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens.** *World Journal of Gastroenterology.* 24:48 (2018) 5418-5432.
82. MARINCOLA, F. M., JAFFEE, E. M., HICKLIN D. J., FERRONE, S. – **Escape of human solid tumors from t-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance.** *Advances in Immunology.* 74 (2000) 181-273.
83. SELIGER, B., CABRERA, T., GARRIDO, F., FERRONE, S. – **HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells.** *Seminars In Cancer Biology.* 12:1 (2002) 3-13.
84. MCCONKEY, S.J., REECE, W. H. H., MOOETHY, V. S., WEBSTER, D., DUNACHIE S., BUTCHER, G., VUOLA, J.M., BLANCHARD, T. J., GOTHARD, P., WATKINS, K., HANNAN, C. M., EVERAERE, S., BROWN, K., KESTER, K. E., CUMMINGS, J., WILLIAMS, J., HEPPNER, G., PATHAN, A., FLANAGAN, K., ARULANANTHAM, N., ROBERTS, M. T. M., ROY, M., SMITH, G. L., SCHNEIDER, J., PETO, T., SINDEN, R. E., GILBERT, S. C., HILL, A. V. S. – **Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans.** *Nature Medicine.* 9:6 (2003) 729-735.
85. MELERO, I., GAUDERNACK, G., GERRITSEN, W., HUBER, C., PARMIANI, G., SCHOLL, S., THATCHER, N., WAGSTAFF, J., ZIELINSKI, C., FAULKNER, I., MELLSTEDT, H. – **Therapeutic vaccines for cancer: An overview of clinical trials.** *Nature Reviews*

- Clinical Oncology. 11:9 (2014) 509-524.
86. CONRY, R. M., LOBUGLIO, A. F., WRIGHT, M., SUMEREL, L., PIKE, M. J., JOHANNING, F., BENJAMIN, R., LU, D., CUIEL, D. T. – **Characterization of a Messenger RNA Polynucleotide Vaccine Vector.** Cancer Research. 55:7 (1995) 1397-1400.
87. BOCZKOWSKI, D., NAIR, S. K., SNYDER, D., GILBOA, E. – **Dendritic Cells Pulsed with RNA are Potent Antigen-presenting Cells In Vitro and In Vivo.** Journal of Experimental Medicine. 184:2 (1996) 465-472.
88. RIAZ, N., HAVEL, J. J., MARAKOV, V., DESRICHARD, A., URBA, W. J., SIMS, J. S., HODI, F. S., MARTÍN-ALGARRA, S., MANDAL, R., SHARFMAN, W. H., BHATIA, S., HWU, W. J., GAJEWSKI, T. F., SLINGLUFF, C. L., CHOWELL, D., KENDALL, S. M., CHANG, H., SHAH, R., KUO, F., MORRIS, L. G. T., SIDHOM, J.-H., SCHNECK, J. P., HORAK, C. E., WEINHOLD, N., CHAN, T. A. – **Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab.** Cell. 171:4 (2017) 934-949.e15.
89. MELIEF, C., VAN DER BURG, S. H. – **Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines.** Nature Reviews Cancer. 8:5 (2008) 351-360.
90. PLEASANCE, E. D., CHEETHAM, R. K., STEPHENS, P. J., MCBRIDE, D. J., SEAN, J., GREENMAN, C. D., VARELA, I., LIN, M.-L., ORDÓÑEZ, G. R., BIGNELL, G. R., YE, K., ALIPAZ, J., BAUER, M. J., BEARE, D., BUTLER, A., CARTER, R. J., CHEN, L., COX, A. J., EDKINS, S., KOKKO-GONZALES, P. I., GORMLEY, N. A., GROCOCK, R. J., HAUDENSCHILD, C. D., HIMS, M. M., JAMES, T., JIA, M., KINGSBURY, Z., LEROY, C., MARSHALL, J., MENZIES, A., MUDIE, L. J., NING, Z., ROYCE, T., SCHULZ-TRIEGLAFF, O. B., SPIRIDOU, A., STEBBINGS, L. A., SZAJKOWSKI, L., TEAGUE, J., CHIN, L., ROSS, M. T., CAMPBELL, P. J., BENTLEY, D. R., ANDREW, P., STRATTON, M. R. – **A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome.** Nature. 463:7278 (2010) 191-196.
91. AERTS-TOEGAERT, C., HEIRMAN, C., TUYAERTS, S., CORTHALS, J., AERTS, J. L., BONEHILL, A., THIELEMANS, K., BRECKPOT, K., BREACKPOT, K. – **CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune response.** European Journal of Immunology. 37:3 (2007) 686-695.
92. DANNULL, J., NAIR, S., SU, Z., BOCZKOWSKI, D., DEBECK, C., YANG, B., GILBOA, E., VIEWEG, J. – **Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand.** Blood. 105:8 (2005) 3206-3213.

93. GRÜNEBACH, F., KAYSER, K., WECK, M. M., MÜLLER, M. R., APPEL, S., BROSSART, P. – **Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T lymphocytes.** *Cancer Gene Therapy*. 12:9 (2005) 749-756.
94. BONTKES, H. J., KRAMER, D., RUIZENDAAL, J. J., KUETER, E. W. M., VAN TENDELOO, V. F. I., MEIJER, C. J. L. M., HOOIJBERG, E. – **Dendritic cells transfected with interleukin-12 and tumor-associated antigen messenger RNA induce high avidity cytotoxic T cells.** *Gene Therapy*. 14:4 (2007) 366-375.
95. BONTKES, H. J., KRAMER, D., RUIZENDAAL, J. J., MEIJER, C. J. L. M., HOOIJBERG, E. – **Tumor associated antigen and interleukin-12 mRNA transfected dendritic cells enhance effector function of natural killer cells and antigen specific T-cells.** *Clinical Immunology*. 127:3 (2008) 375-384.
96. BONEHILL, A., TUYAERTS, S., VAN NUFFEL, A. M. T., HEIRMAN, C., BOS, T. J., FOSTIER, K., NEYNS, B., THIELEMANS, K. – **Enhancing the T-cell Stimulatory Capacity of Human Dendritic Cells by Co-electroporation With CD40L, CD70 and Constitutively Active TLR4 Encoding mRNA.** *Molecular Therapy*. 16:6 (2008) 1170-1180.
97. WILGENHOLF, S., VAN NUFFEL, A. M. T., CORTHALS, J., HEIRMAN, C., TUYAERTS, S., BENTEYN, D., DE CONINCK, A., VAN RIET, I., VERFAILLIE, G., VANDELOO, J., BONEHILL, A., THIELEMANS, K., NEYNS, B. – **Therapeutic Vaccination With an Autologous mRNA Electroporated Dendritic Cell Vaccine in Patients With Advanced Melanoma.** *Journal of Immunotherapy*. 34:5 (2011) 448-456.
98. VAN LINT, S., WILGENHOF, S., HEIRMAN, C., CORTHALS, J., BRECKPOT, K., BONEHILL, A., NEYNS, B., THIELEMANS, K. – **Optimized dendritic cell-based immunotherapy for melanoma: The TriMix-formula.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 63:9 (2014) 959-967.
99. WILGENHOLF, S., VAN NUFFEL, A. M. T., BENTEYN, D., CARTHALS, J., AERTS, C., HEIRMAN, C., VAN RIET, I., BONEHILL, A., THIELEMANS, K., NEYNS, B. – **A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients.** *Annals of Oncology*. 24:10 (2013) 2686-2693.
100. HODI, F. S., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J. J., RUTKOWSKI, P., COWEY, C. L., LAO, C. D., SCHADENDORF, D., WAGSTAFF, J., DUMMER, R.,

- FERRUCCI, P. F., SMYLLIE, M., HILL, A., HOGG, D., MARQUEZ-RODAS, I., JIANG, J., RIZZO, J., LARKIN, J., WOLCHOK, J. D. – **Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial.** *The Lancet Oncology*. 19:11 (2018) 1480-1492.
101. BOUDEWIJNS, S., BLOEMENDAL, M., DE HAAS, N., WESTDORP, H., BOL, K. F., SCHREIBELT, G., AARNTZEN, E. H. J. G., LESTERHUIS, W. J., GORRIS, M. A. J., CROOCKEWIT, A., VAN DER WOUDE, L. L., VAN ROSSUM, M. M., WELZEN, M., DE GOEDE, A., HATO, S. V., VAN DER GRAAF, W. T. A., PUNT, C. J. A., KOORNSTRA, R. H. T., GERRITSEN, W. R., FIGDOR, C. G., DE VRIES, I. J. M. – **Autologous monocyte-derived DC vaccination combined with cisplatin in stage III and IV melanoma patients: a prospective, randomized phase 2 trial.** *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 69:3 (2020) 477-488.
102. VAN WILLIGEN, W. W., BLOEMENDAL, M., GERRITSEN, W. R., SCHREIBELT, G., DE VRIES, I. J. M., BOL, K. F. – **Dendritic Cell Cancer Therapy: Vaccinating the Right Patient at the Right Time.** *Frontiers in Immunology*. 9 (2018) 1-13.
103. AMIN, A., DUDEK, A. Z., LOGAN, T. F., LANCE, R. S., HOLZBEIERLEIN, J. M., KNOX, J. J., MASTER, V. A., PAL, S. K., MILLER, W. H., KARSH, L. I., TCHEREPANOVA, I. Y., DEBENEDETTE, M. A., WILLIAMS, W. L., PLESSINGER, D. C., NICOLETTE, C. A., FIGLIN, R. A. – **Survival with AGS-003, an autologous dendritic cell-based immunotherapy, in combination with sunitinib in unfavorable risk patients with advanced renal cell carcinoma (RCC): Phase 2 study results.** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 3:1 (2015) 1-13.
104. FIGLIN, R. A., TANNIR, N. M., UZZO, R. G., TYKODI, S. S., CHEN, D. Y. T., MASTER, V., KAPOOR, A., VAENA, D., LOWRANCE, W. T., BRATSLAVSKY, G., DEBENEDETTE, M., GAMBLE, A., PLACHCO, A., NORRIS, M. S., HORVATINOVICH, J., TCHEREPANOVA, I. Y., NICOLETTE, C. A., WOOD, C. G. – **Results of the ADAPT phase 3 study of Rocapuldencel-T in combination with sunitinib as first-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma.** *Clinical Cancer Research*. 26:10 (2020) 2327-2336.
105. MITCHELL, D. A., BATICH, K. A., GUNN, M. D., HUANG, M. N., SANCHEZ-PEREZ, L., NAIR, S. K., CONGDON, K. L., REAP, E. A., ARCHER, G. E., DESJARDINS, A., FRIEDMAN, A. H., FRIEDMAN, H. S., HERNDON, J. E., COAN, A., MCLENDON, R. E.,

- REARDON, D. A., VREDENBURGH, J. J., BIGNER, D. D., SAMPSON, J. H. – **Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients.** *Nature.* 519:7543 (2015) 366-369.
106. BATICH, K. A., REAP, E. A., ARCHER, G. E., SANCHEZ-PEREZ, L., NAIR, S. K., SCHMITTLING, R. J., NORBERG, P., XIE, W., HERNDON, J. E., HEALY, P., MCLENDON, R. E., FRIEDMAN, A. H., FRIEDMAN, H. S., BIGNER, D., VLAHOVIC, G., MITCHELL, D. A., SAMPSON, J. H. – **Long-term Survival in Glioblastoma with Cytomegalovirus pp65-Targeted Vaccination.** *Clinical Cancer Research.* 23:8 (2017) 1898-1909.
107. LIAU, L. M., ASHKAN, K., TRAN, D. D., CAMPIAN, J. L., TRUSHEIM, J. E., COBBS, C. S., HETH, J. A., SALACZ, M., TAYLOR, S., D'ANDRE, S. D., IWAMOTO, F. M., DROPCHO, E. J., MOSHEL, Y. A., WALTER, K. A., PILLAINAYAGAM, C. P., AIKEN, R., CHAUDHARY, R., GOLDLUST, S. A., BOTA, D. A., DUIC, P., GREWAL, J., ELINZANO, H., TOMS, S. A., LILLEHEI, K. O., MIKKELSEN, T., WALPERT, T., ABRAM, S. R., BRENNER, A. J., BREM, S., EWEND, M. G., KHAGI, S., PORTNOW, J., KIM, L. J., LOUDON, W. G., THOMPSON, R. C., AVIGAN, D. E., FINK, K. L., GEOFFROY, F. J., LINDHORST, S., LUTZKY, J., SLOAN, A. E., SCHACKERT, G., KREX, D., MEISEL, H. J., WU, J., DAVIS, R. P., DUMA, C., ETAME, A. B., MATHIEU, D., KESARI, S., PICCIONI, D., WESTPHAL, M., BASKIN, D. S., NEW, P. Z., LACROIX, M., MAY, S. A., PLUARD, T. J., TSE, V., GREEN, R. M., VILLANO, J. L., PEARLMAN, M., PETRECCA, K., SCHULDER, M., TAYLOR, L. P., MAIDA, A. E., PRINS, R. M., CLOUGHESY, T. F., MULHOLLAND, P., BOSCH, M. L. – **First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma.** *Journal of Translational Medicine.* 16:142 (2018) 1-9.
108. COLLIN, M., BIGLEY, V. – **Human dendritic cell subsets: an update.** *Immunology.* 154:1 (2018) 3-20.
109. HAABETH, O. A. W., BLAKE, T. R., MCKINLAY, C. J., TVEITA, A. A., SALLET, A., WAYMOUTH, R. M., WENDER, P. A., LEVY, R. – **Local Delivery of OX40L, CD80, and CD86 mRNA Kindles Global Anticancer Immunity.** *Cancer Research.* 79:7 (2019) 1624-1634.
110. VAN DER JEUGHT, K., JOE, P. T., BIALKOWSKI, L., HEIRMAN, C., DASZKIEWICZ, L., LIECHTENSTEIN, T., ESCORS, D., THIELEMANS, K., BRECKPOT, K. – **Intratumoral administration of mRNA encoding a fusokine consisting of IFN- β and the ectodomain of the TGF- β receptor ii potentiates antitumor immunity.**

Oncotarget. 5:20 (2014) 10100-10113.

111. VAN LINT, S., RENMANS, D., BROOS, K., GOETHALS, L., MAENHOUT, S., BENTEYN, D., GOYVAERTS, C., DU FOUR, S., VAN DER JEUGHT, K., BIALKOWSKI, L., FLAMAND, V., HEIRMAN, C., THIELEMANS, K., BRECKPOT, K. – **Intratumoral Delivery of TriMix mRNA Results in T-cell Activation by Cross-Presenting Dendritic Cells.** Cancer Immunology Research. 4:2 (2016) 146-156.
112. CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., WOLCHOK, J. D. – **Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy.** Immunity. 44:5 (2016) 1069-1078.
113. HEWITT, S. L., BAI, A., BAILEY, D., ICHIKAWA, K., ZIELINSKI, J., KARP, R., APTE, A., ARNOLD, K., ZACHAREK, S. J., ILIOU, M. S., BHATT, K., GARNAAS, M., MUSENGE, F., DAVIS, A., KHATWANI, N., SU, S. V., MACLEAN, G., FARLOW, S. J., BURKE, K., FREDERICK, J. P. – **Durable anticancer immunity from intratumoral administration of IL-23, IL-36 γ , and OX40L mRNA.** Science Translational Medicine. 11:477 (2019).
114. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **Intratumoral TriMix Injections in Early Breast Cancer Patients (TMBA)** [NCT03788083]. [Consultado a 10 junho 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03788083>
115. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **A First-in-Human Dose Escalation and Expansion Study to Evaluate Intratumoral Administration of SAR441000 as Monotherapy and in Combination With Cemiplinab in Patients With Advanced Solid Tumors** [NCT03871348]. [Consultado a 15 junho 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03871348>
116. HAABETH, O. A. W., BLAKE, T. R., MCKINLAY, C. J., WAYMOUTH, R. M., WENDER, P. A., LEVY, R. – **mRNA vaccination with charge-altering releasable transporters elicits human T cell responses and cures established tumors in mice.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 115:39 (2018) E9153-E9161.
117. ZHANG, X., SHARMA, P. K., PETER GOEDEGEBUURE, S., GILLANDERS, W. E. – **Personalized cancer vaccines: Targeting the cancer mutanome.** Vaccine. 35:7 (2017) 1094-1100.
118. KREITER, S., VORMEHR, M., VAN DE ROEMER, N., DIKEN, M., LÖWER, M., DIEKMANN, J., BOEGEL, S., SCHRÖRS, B., VASCOTTO, F., CASTLE, J. C., TADMOR,

- A. D., SCHOENBERGER, S. P., HUBER, C., TÜRECI, O., SAHIN, U. – **Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer.** *Nature*. 520:7549 (2015) 692-696.
119. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **Safety, Tolerability, and Immunogenicity of mRNA-4157 Alone in Subjects With Resected Solid Tumors and in Combination With Pembrolizumab in Subjects With Unresectable Solid Tumours (KEYNOTE-603)** [NCT03313778]. [Consultado a 15 junho 2020]. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03313778>
120. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **An Efficacy Study of Adjuvant Treatment With the Personalized Cancer Vaccine mRNA-4157 and Pembrolizumab in Patients With High-Risk Melanoma (KEYNOTE-942)** [NCT03897881]. [Consultado a 17 junho 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03897881?term=mRNA-4157&rank=1>
121. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **A Study of RO7198457 as a Single Agent and in Combination With Atezolizumab in Participants With Locally Advanced or Metastatic Tumors** [NCT03289962]. [Consultado a 17 junho 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03289962>
122. U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – **A Study to Evaluate The Efficacy And Safety Of RO7198457 In Combination With Pembrolizumab Versus Pembrolizumab Alone In Patients With Previously Untreated Advanced Melanoma. (IMCODE001)** [NCT03815058]. [Consultado a 17 junho 2020]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03815058>
123. FREUDENMANN, L. K., MARCU, A., STEVANOVIĆ, S. – **Mapping the tumour human leukocyte antigen (HLA) ligandome by mass spectrometry.** *Immunology*. 154:3 (2018) 331-345.
124. PASTOR, F., BERRAONDO, P., ETXEBERRIA, I., FREDERICK, J., SAHIN, U., GILBOA, E., MELERO, I. – **An rna toolbox for cancer immunotherapy.** *Nature Reviews, Drug Discovery*. 17:10 (2018) 751-767.
125. GOSWAMI, S., WANG, W., ARAKAWA, T., OHTAKE, S. – **Developments and Challenges for mAb-Based Therapeutics.** *Antibodies*. 2:4 (2013) 452-500.
126. GARBER, K. – **Bispecific antibodies rise again.** *Nature Reviews, drug Discovery*. 13:11 (2014) 799-801.

127. STADLER, C. R., BÄHR-MAHMUD, H., CELIK, L., HEBICH, B., ROTH, A. S., ROTH, R. P., KARIKÓ, K., TÜRECI, Ö., SAHIN, U. – **Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies.** *Nature Medicine.* 23:7 (2017) 815-817.
128. THRAN, M., MUKHERJEE, J., PÖNISCH, M., FIEDLER, K., THESS, A., MUI, B. L., HOPE, M. J., TAM, Y. K., HORSCROFT, N., HEIDENREICH, R., FOTIN-MLECZEK, M., SHOEMAKER, C. B., SCHLAKE, T. – **mRNA mediates passive vaccination against infectious agents, toxins, and tumors.** *EMBO Molecular Medicine.* 9:10 (2017) 1434-1447.
129. RYBAKOVA, Y., KOWALSKI, P. S., HUANG, Y., GONZALEZ, J. T., HEARTLEIN, M. W., DEROSA, F., DELCASSIAN, D., ANDERSON, D. G. – **mRNA Delivery for Therapeutic Anti-HER2 Antibody Expression In Vivo.** *Molecular Therapy.* 27:8 (2019) 1415-1423.
130. PARDI, N., SECRETO, A. J., SHAN, X., DEBONERA, F., GLOVER, J., YI, Y., MURAMATSU, H., NI, H., MUI, B. L., TAM, Y. K., SHAHEEN, F., COLLMAN, R. G., KARIKÓ, K., DANET-DESNOVERS, G. A., MADDEN, T. D., HOPE, M. J., WEISSMAN, D. – **Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge.** *Nature Communications.* 8:14630 (2017) 6-13.
131. TIWARI, P. M., VANOVER, D., LINDSAY, K. E., BAWAGE, S. S., KIRSCHMAN, J. L., BHOSLE, S., LIFLAND, A. W., ZURLA, C., SANTANGELO, P. J. – **Engineered mRNA-expressed antibodies prevent respiratory syncytial virus infection.** *Nature Communications.* 9:3999 (2018).
132. ZUBIAGA, A. M., BELASCO, J. G., GREENBERG, M. E. – **The Nonamer UUAUUUAUU Is the Key AU-Rich Sequence Motif That Mediates mRNA Degradation.** *Molecular and Cellular Biology.* 15:4 (1995) 2219-2230.
133. KEENE, J. D. – **RNA regulons: Coordination of post-transcriptional events.** *Nature Reviews Genetics.* 8:7 (2007) 533-543.
134. SADLER, A. J., WILLIAMS, B. R. G. – **Interferon-inducible antiviral effectors.** *Nature Reviews Immunology.* 8:7 (2008) 559-568.
135. KOWALSKA, J., DEL NOGAL, A. W., DARZYNKIEWICZ, Z. M., BUCK, J., NICOLA, C., KUHN, A. N., LAKASZEWICZ, M., ZUBEREK, J., STRENKOWSKA, M., ZIEMNIAK, M., MACIEJCZYK, M., BOKARSKA, E., RHOADS, R. E., DARZYNKIEWICZ, E., SAHIN,

- U., JAMIELITY, J. – **Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: Versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes.** *Nucleic Acids Research.* 42:16 (2014) 1024-10264.
136. STRENKOWSKA, M., GRZELA, R., MAJEWSKI, M., WNEK, K., KOWALSKA, J., LUKASZEWICZ, M., ZUBEREK, J., DARZYNKIEWICZ, E., KUHN, A. N., SAHIN, U., JEMIELITY, J. – **Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential.** *Nucleic Acids Research.* 44:20 (2016) 9578-9590.
137. STEPINSKI, J., WADDELL, C., STOLARSKI, R., DARZYNKIEWICZ, E., RHOADS, R. E. – **Synthesis and properties of mRNAs containing the novel ‘anti-reverse’ cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG.** *RNA.* 7:10 (2001) 1486-1495.
138. PRESNYAK, V., ALHUSAINI, N., CHEN, Y. H., MARTIN, S., MORRIS, N., KLINE, N., OLSON, S., WEINBERG, D., BAKER, K. E., GRAVELEY, B. R., COLLER, J. – **Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability.** *Cell.* 160:6 (2015) 1111-1124.
139. SVITKIN, Y. V., CHENG, Y. M., CHAKRABORTY, T., PRESNYAK, V., JOHN, M., SONENBERG, N. – **N1-methyl-pseudouridine in mRNA enhances translation through eIF2 α -dependent and independent mechanisms by increasing ribosome density.** *Nucleic Acids Research.* 45:10 (2017) 6023-6036.
140. DIKEN, M., KREITER, S., SELMI, A., BRITTEN, C. M., HUBER, C., TÜRECI, Ö., SAHIN, U. – **Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation.** *Gene Therapy.* 18:7 (2011) 702-708.
141. CLAUSEN, B. E., STOITZNER, P. – **Functional specialization of skin dendritic cell subsets in regulating T cell responses.** *Frontiers in Immunology.* 6:OCT (2015) 1-19.
142. ALBERER, M., GNAD-VOGT, U., HONG, H. S., MEHR, K. T., BACKERT, L., FINAK, G., GOTTARDO, R., BICA, M. A., GAROFANO, A., KOCH, S. D., FOTIN-MLECZEK, M., HOERR, I., CLEMENS, R., VON SONNENBURG, F. – **Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase I clinical trial.** *The Lancet.* 390:10101 (2017)

1511-1520.

143. CROWLEY, S. T., POLISKEY, J. A., BAUMHOVER, N. J., RICE, K. G. – **Efficient expression of stabilized mRNA PEG-peptide polyplexes in liver.** *Gene Therapy*. 22:12 (2015) 993-999.
144. MCKINLAY, C. J., VARGAS, J. R., BLAKE, T. R., HARDY, J. W., KANADA, M., CONTAG, C. H., WENDER, P. A., WAYMOUTH, R. M. – **Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114:4 (2017) E448-E456.
145. MCKINLAY, C. J., BENNER, N. L., HAABETH, O. A., WAYMOUTH, R. M., WENDER, P. A. – **Enhanced mRNA delivery into lymphocytes enabled by lipid-varied libraries of charge-altering releasable transporters.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 115:26 (2018) E5859-E5866.
146. BENNER, N. L., NEAR, K. E., BACHMANN, M. H., CONTAG, C. H., WAYMOUTH, R. M., WENDER, P. A. – **Functional DNA Delivery Enabled by Lipid-Modified Charge-Altering Releasable Transporters (CARTs).** *Biomacromolecules*. 19:7 (2018) 2812-2824.
147. CAMPANI, V., GIARRA, S., DE ROSA, G. – **Lipid-based core-shell nanoparticles: Evolution and potentialities in drug delivery.** *OpenNano*. 3 (2018) 5-17.
148. ISHIDA, T., ICHIHARA, M., WANG, X. Y., YAMAMOTO, K., KIMURA, J., MAJIMA, E., KIWADA, H. – **Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes.** *Journal of Controlled Release*. 112:1 (2006) 15-25.
149. MODERNATX – **Modalities: mRNA Vaccines, Therapeutics, and Immunology.** [Consultado a 22 de junho 2020]. Disponível em: <https://www.modernatx.com/modalities-mrna-vaccines-therapeutics-and-immunology>
150. CUREVAC – **Our Pipeline.** [Consultado a 22 de junho 2020]. Disponível em: <https://www.curevac.com/our-pipeline>
151. PARDI, N., HOGAN, M. J., PORTER, F. W., WEISSMAN, D. – **mRNA vaccines - a new era in vaccinology.** *Nature Reviews Drug Discovery*. 17:4 (2018) 261-279.
152. SUSCHAK, J. J., WILLIAMS, J. A., SCHMALJOHN, C. S. – **Advancements in DNA**

vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 13:12 (2017) 2837-2848.

I 53. RAUCH, S., JASNY, E., SCHMIDT, K. E., PETSCH, B. – **New vaccine technologies to combat outbreak situations.** Frontiers in Immunology. 9:1963 (2018).

I 54. SCHLAKE, T., THESS, A., THRAN, M., JORDAN, I. – **mRNA as novel technology for passive immunotherapy.** Cellular and Molecular Life Sciences. 76:2 (2019) 301-328.