



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Sofia Veloso Costa

Relatórios de Estágio orientados por Dra. Rosa Cartaxo e Dra. Dina Lopes e Monografia intitulada “Inteligência Artificial no desenvolvimento de vacinas mRNA para o tratamento do cancro” orientada por Professor Doutor João Nuno Moreira referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Sofia Veloso Costa

Relatórios de Estágio orientados por Dra. Rosa Cartaxo e Dra. Dina Lopes e Monografia intitulada "Inteligência Artificial no desenvolvimento de vacinas mRNA para o tratamento do cancro" orientada por Professor Doutor João Nuno Moreira referentes à Unidade Curricular "Estágio", apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

O trabalho de revisão bibliográfica – “Inteligência Artificial no desenvolvimento de vacinas mRNA para o tratamento do cancro” – teve o apoio do projeto CInTech – Technological Hub for Innovation, Translation and Industrialization of Complex Injectable Drugs –, com a referência n.º C644865576-00000005, co-financiado pela Componente C5 – Capitalização e Inovação Empresarial integrada na Dimensão Resiliência do Plano de Recuperação e Resiliência (PRR), através do fundo NextGenerationEU.

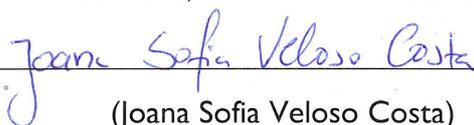


Setembro 2023

Eu, Joana Sofia Veloso Costa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2018278390, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Inteligência Artificial no desenvolvimento de vacinas mRNA para o 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, 5 de setembro de 2023.



(Joana Sofia Veloso Costa)

AGRADECIMENTOS

No culminar desta etapa tão importante, quero agradecer a toda a minha família pelo apoio incondicional. Aos meus pais por acreditarem em mim, incentivarem a seguir os meus sonhos e a ambicionar por mais e, também, por me mostrarem que as advertências que surgem pelo caminho são meros desafios a superar, tornando assim a conclusão de mais uma etapa possível. À minha irmã por ser companheira, amiga e pela compreensão nos momentos mais difíceis. Aos meus avós por estarem sempre presentes, serem amor e ombro amigo que tornam tudo possível e mais fácil, um obrigado nunca será suficiente. À minha madrinha pelo carinho e apoio demonstrado em todas as etapas da minha vida.

A todos os meus amigos que me acompanharam durante este e outros percursos.

Ao Diogo e à Débora por tudo o que já vivemos e aprendemos juntos.

À Bárbara por me ter acolhido tão bem, pelos conselhos e paciência, mas sobretudo pela amizade que para a vida construímos. À Diana, Inês, Joana e Inês por todos os momentos e memórias criadas, pela bonita amizade que estará sempre presente, sem vocês estes 5 anos não teriam sido tão especiais. Aos “Sandros” por todos os convívios que criaram histórias épicas e memórias que levo para a vida.

Ao meu orientador, Professor Doutor João Nuno Moreira pela disponibilidade demonstrada ao longo da redação da monografia e por todos os conselhos.

A toda a equipa da Farmácia Cortesão, Dra. Rosa Cartaxo, Dra. Teresa Nunes, Dr. Diogo Sousa, Dr. Francisco Teixeira e Dr. Mário Vintém pela receção calorosa e por todos os conhecimentos e valores transmitidos.

À Dra. Dina Lopes e Dra. Sandra Monteiro pela oportunidade proporcionada, disponibilidade e simpatia demonstradas durante o a realização do estágio.

A Coimbra, cidade que sempre me acolheu e às memórias aqui vividas,

Obrigada!

“If you are interested in what you do, that keeps you going”

- Stan Lee

ÍNDICE

Parte I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	8
1. Introdução.....	9
2. Farmácia Cortesão	9
3. Análise SWOT	10
3.1 Pontos Fortes.....	10
3.1.1 Integração na equipa da farmácia	10
3.1.2 Plano de estágio	11
3.1.3 Grande afluência e Diversidade dos utentes	12
3.1.4 Preparação de medicamentos manipulados.....	12
3.2 Pontos Fracos	12
3.2.1 Desconhecimento de nomes comerciais e marcas de produtos.....	12
3.2.2 Dificuldade inicial na comunicação com os utentes.....	13
3.3 Oportunidades.....	13
3.3.1 Gabinete de Atendimento ao Utente	13
3.3.2 Estágio de verão.....	14
3.3.3 Formações externas.....	14
3.3.4 Valormed	14
3.4 Ameaças	15
3.4.1 Medicamentos esgotados.....	15
3.4.2 Situação socioeconómica do país.....	15
4. Considerações Finais	15
5. Casos Práticos.....	16
6. Bibliografia.....	19

Parte II - Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.

Lista de Abreviaturas	21
1. Introdução.....	22
2. INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.	22
3. Direção de Avaliação de Medicamentos	23
4. Análise SWOT	24
4.1 Pontos Fortes.....	24
4.1.1 Formação inicial.....	24
4.1.2 Contacto com o ritmo de trabalho em Assuntos Regulamentares	24
4.1.3 Autonomia de trabalho	25
4.1.4 Plataformas eletrónicas internas.....	25
4.2 Pontos Fracos	26
4.2.1 Duração do estágio	26
4.2.2 Interação com outras Direções do INFARMED	26
4.3 Oportunidades.....	27
4.3.1 Portugal como Estado Membro de Referência	27
4.3.2 Inglês técnico	27
4.4 Ameaças	27

4.4.1	Pedidos de avaliação incompletos submetidos pelos TAIM.....	27
4.4.2	Invalidações de processos por outros Estados-Membros.....	28
4.4.3	Recursos humanos.....	28
5.	Considerações Finais	29
6.	Bibliografia.....	30

Parte III - Monografia: "Inteligência Artificial no desenvolvimento de vacinas mRNA para o tratamento do cancro"

ABSTRACT	32
RESUMO.....	33
Lista de Abreviaturas	34
1. Introdução.....	35
2. Antígenos tumorais.....	36
3. Vacinas mRNA.....	37
3.1 mRNA.....	37
3.2 Sistemas de entrega <i>in vivo</i> de mRNA	39
3.3 Adjuvantes	41
3.4 Vacinas mRNA na imunoterapia do cancro.....	41
3.4.1 Mecanismos de ação das vacinas mRNA.....	42
4. Inteligência Artificial (IA).....	43
4.1 Utilização de IA no desenvolvimento de novas moléculas personalizadas	44
4.1.1 <i>Optimus 5-Prime</i> – Eficácia de tradução de proteínas.....	45
4.1.2 Mapeamento com <i>Deep Learning</i> com material genético de cada indivíduo.....	46
4.1.3 Barreiras extracelulares	46
4.1.4 Previsão toxicidade dos materiais usados - veículo de entrega	47
4.2 Modelos IA para o <i>design</i> de vacinas mRNA	48
4.3 Vacina personalizada com neoantígeno TG4050	50
5. Conclusões e Perspetivas futuras	51
6. Bibliografia.....	53

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Orientador: Dra. Rosa Cartaxo

Lista de Abreviaturas

AINE – Anti-inflamatório não esteróide

FC – Farmácia Cortesão

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

PNV – Plano Nacional de Vacinação

SOWT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

TRAg – Teste Rápido de Antígeno

1. Introdução

A farmácia comunitária, devido à sua proximidade e acessibilidade à população, é, frequentemente, o primeiro estabelecimento que o utente procura por questões de saúde. Deste modo, é responsabilidade do farmacêutico assegurar a máxima qualidade dos serviços prestados, devendo este proporcionar um aconselhamento eficaz e seguro, assim como também fazer a cedência de medicamentos e promover o uso racional dos mesmos¹.

Na última etapa do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), a realização do estágio curricular em farmácia comunitária permite aos estudantes colocar em prática os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do percurso académico, assim como aprimorar os mesmos e aprender mais no contexto do quotidiano de uma farmácia. A junção de todos estes fatores tem em vista a formação de um profissional de saúde competente.

O presente relatório é destinado à realização de uma análise crítica do estágio curricular na Farmácia Cortesão (FC). Este percurso decorreu entre janeiro e abril de 2023, sob a orientação da Dra. Rosa Cartaxo. A análise é feita segundo o modelo SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) de modo a abordar os aspetos positivos e negativos identificados no decorrer do estágio. Os Pontos Fortes e Pontos Fracos englobam a dimensão interna e as Oportunidades e Ameaças a dimensão externa (Tabela 1).

2. Farmácia Cortesão

A Farmácia Cortesão atualmente encontra-se sob a Direção Técnica da Dra. Rosa Cartaxo. Localiza-se na freguesia de São Silvestre pertencente ao concelho e distrito de Coimbra. O objetivo de melhoria da qualidade de vida dos seus utentes faz com que a sua principal missão seja a prestação de serviços de saúde de excelência.

O espaço de atendimento ao público é constituído por quatro postos de trabalho, sendo cada um equipado por um computador, no qual estão inseridos os sistemas informáticos Sifarma 2000[®] e Sifarma Módulo Atendimento[®], uma impressora fiscal e um leitor ótico. Neste espaço encontra-se uma área de exposição para os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), situada atrás dos balcões de atendimento. Lineares de exposição de outros produtos de saúde, nomeadamente, cosméticos, higiene oral, proteção solar e de bebé e criança também se encontram nesta sala.

O gabinete de atendimento personalizado, permite realizar um acompanhamento mais reservado ao utente, a medição de parâmetros bioquímicos (tensão arterial, glicémia capilar e

colesterol total), a prestação de serviços externos (consultas de nutrição e serviço de podologia), como também a administração de vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação (PNV) e injetáveis; este espaço é também dotado de uma balança. A realização de testes rápidos de antigénio (TRAg) de uso profissional, é efetuada neste espaço, com as respetivas medidas de segurança.

O funcionamento da farmácia é assegurado pela equipa técnica, que conta com cinco colaboradores, três farmacêuticos e dois técnicos de farmácia. O horário que vigora na FC permite assegurar aos utentes a completa disponibilidade da mesma, sendo este das 9:00 às 19:30 em dias úteis, das 9:00 às 13:00 aos sábados e das 10:00 às 12:30 aos domingos e feriados.

3. Análise SWOT

Tabela I: Análise SWOT

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none"> • Integração na equipa da farmácia • Plano de estágio • Grande Afluência e Diversidade dos Utes • Preparação de medicamentos manipulados 	<ul style="list-style-type: none"> • Desconhecimento de nomes comerciais e marcas de produtos • Dificuldade inicial na comunicação com os utentes
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none"> • Gabinete de Atendimento do Ute • Estágio de verão • Formações externas • Valormed 	<ul style="list-style-type: none"> • Medicamentos esgotados • Situação socioeconómica do país

3.1 Pontos Fortes

3.1.1 Integração na equipa da farmácia

O estágio curricular em farmácia comunitária teve início no dia 9 de janeiro de 2023, e desde este primeiro dia até ao último fui sempre muito bem recebida na FC. O ambiente acolhedor e a boa disposição da equipa sem dúvida que facilitaram a minha integração na mesma. O interesse pela minha aprendizagem esteve sempre presente no decorrer do estágio

e o mesmo foi demonstrado através da disponibilidade para responder às questões que colocava, do auxílio sempre que necessário e na transmissão de conhecimentos através do incentivo a estar envolvida nas diferentes tarefas da farmácia.

A minha aprendizagem ao longo do estágio foi impactada positivamente pelas boas relações de trabalho estabelecidas com toda a equipa, estas permitiram a minha evolução e aumento de confiança como futura profissional. Deste modo, a equipa da farmácia tornou-se um ponto forte do meu estágio.

3.1.2 Plano de estágio

Um plano de estágio bem estruturado é fundamental para o sucesso do estagiário. O estágio em farmácia comunitária teve a duração de quatro meses e ao longo deste período fui sendo exposta às diferentes tarefas que um farmacêutico desempenha numa farmácia, sendo a introdução a cada uma destas feita de forma gradual, de modo a possibilitar uma perceção lógica de todo o sistema da farmácia.

Iniciei o estágio com a arrumação de produtos, de modo a haver adaptação com a organização e disposição dos mesmos, assim como com as diferentes marcas e indicações terapêuticas. A receção e realização de encomendas foi a tarefa seguinte a desempenhar. Estas atividades são essenciais para o bom funcionamento de toda a farmácia e permitem ao estagiário a familiarização com os medicamentos, que posteriormente facilita o atendimento ao público.

O atendimento ao público foi a atividade mais desafiante. Inicialmente esta tarefa era apenas observacional, e com o decorrer do tempo e com o aumento da autonomia e confiança fui realizando mais atendimentos. Esta experiência permitiu-me desenvolver algumas competências, tais como, a capacidade de adaptação de discurso ao tipo de utente, de simplificação de linguagem técnica e espírito crítico.

A gestão de *stocks* e controlo dos prazos de validade é realizada mensalmente através de uma lista gerada com a informação do sistema informático. Nesta lista constam os produtos com validade a expirar nos dois meses seguintes. Após a verificação entre o produto que se encontra na farmácia e a lista, devem ser retirados do local para posterior devolução aos laboratórios ou declarados como quebras.

A gestão do termohigrómetro é uma tarefa também realizada com periodicidade mensal. Consiste na recolha de registos dos diferentes aparelhos de medição de temperatura e humidade, colocados em pontos estratégicos do espaço da farmácia. Após a interpretação de

dados gerados na forma de gráficos, é possível verificar se a temperatura e humidade dentro da farmácia se encontram dentro dos limites estipulados.

A conferência de receituário, nomeadamente das receitas materializadas, permitiu-me adquirir uma maior perceção dos requisitos necessários para estas serem consideradas válidas, facilitando esta análise no momento do atendimento.

3.1.3 Grande afluência e Diversidade dos utentes

No decorrer do estágio foi possível ter contacto com os diversos utentes que frequentam a FC. A grande afluência de utentes é notável, assim como a elevada heterogeneidade entre si. Várias faixas etárias podem ser identificadas, mas também diferentes níveis de literacia na área da saúde. Desta forma, durante os atendimentos havia a necessidade de adaptar o mesmo e o discurso utilizado às necessidades de cada utente.

Assim, esta característica constitui um dos pontos fortes do meu estágio, pois fui exposta a situações variadas que me permitiram desenvolver competências como futura profissional de saúde.

3.1.4 Preparação de medicamentos manipulados

A Portaria n.º 594/2004 define o medicamento manipulado como “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”. Durante o meu estágio, tive a oportunidade de presenciar a preparação de uma solução alcoólica 60° de ácido bórico à saturação. Após a preparação e preenchimento da ficha do manipulado, procede-se o cálculo do preço de venda ao público (PVP) de acordo com a legislação em vigor (Portaria n.º 769/2004), emissão do rótulo e dispensa do produto final.

Esta experiência permitiu não só a aplicação de conhecimentos práticos adquiridos em unidades curriculares do plano de estudos de MICEF, como também possibilitou a perceção de todo o procedimento inerente à preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina, tornando-se assim um ponto forte do meu estágio.

3.2 Pontos Fracos

3.2.1 Desconhecimento de nomes comerciais e marcas de produtos

São diversas as substâncias ativas existentes no mercado farmacêutico, podendo algumas destas ser associadas a mais do que um nome comercial. Deste modo, houve um processo de

familiarização na fase inicial do estágio, nomeadamente a receção e arrumação de produtos e, posteriormente, através do diálogo com o utente durante o atendimento. Muitas das vezes os utentes referiam-se aos seus medicamentos pelo nome comercial, por conseguinte, este aspeto representou uma dificuldade acrescida que foi sendo solucionada através do diálogo e compreensão da indicação terapêutica de cada um dos fármacos.

Os MNSRM e outros produtos de saúde apresentam também uma vasta diversidade de marcas e gamas disponíveis na farmácia. Assim sendo, a identificação destes no momento do atendimento apresentou igualmente um desafio, o reconhecimento da respetiva disposição de cada gama de produtos e a formação por parte da equipa da farmácia permitiu agilizar a assimilação dos mesmos.

Com o decorrer do estágio, estas dificuldades foram progressivamente ultrapassadas quer pelo diálogo anteriormente mencionado, quer pela utilização do sistema Sifarma® e pelo apoio da equipa da farmácia. Contudo, no exercício desta atividade profissional a constante atualização de conhecimento é fundamental.

3.2.2 Dificuldade inicial na comunicação com os utentes

A realização do estágio em farmácia comunitária implica uma fase de adaptação à dinâmica de trabalho presente na mesma. Nesta rotina, estão incluídas tarefas com procedimentos que são novidade e complementam a formação académica, deste modo, numa fase inicial houve alguma insegurança na abordagem aos utentes na execução do atendimento, que se refletiu em dificuldade de comunicação e perceção, da minha parte, das necessidades do utente. Contudo, a prática gerada com o contacto com os utentes, favoreceu o meu desenvolvimento e aumento de confiança no discurso com o utente.

3.3 Oportunidades

3.3.1 Gabinete de Atendimento ao Utente

O gabinete de atendimento ao utente permite prestar ao mesmo uma variedade de serviços, anteriormente referidos, que diferenciam a farmácia pela positiva e que me permitiram adquirir competências que não são aprofundadas durante o percurso académico.

Sendo este um espaço mais reservado, possibilita um contacto mais próximo com o utente surgindo, assim, a oportunidade de diálogo que permite ao utente ter mais abertura para colocar questões e ao profissional de saúde fazer o aconselhamento de forma mais direcionada às necessidades do utente.

3.3.2 Estágio de verão

O estágio de verão em farmácia comunitária, realizado através do programa de estágios extracurriculares da Universidade de Coimbra, é uma mais-valia para a aquisição de competências, que são úteis no decorrer do estágio curricular posteriormente realizado, tais como, a perceção da rotina de uma farmácia e a utilização do *software* Sifarma[®]. Durante o mês de agosto de 2022, realizei o estágio de verão na Farmácia Cortesão. Esta experiência permitiu a familiarização com a equipa e espaço da farmácia, tendo escolhido a FC como local para a realização do estágio curricular. As competências adquiridas durante o estágio de verão facilitaram a execução de tarefas e, assim, o tempo inicial de adaptação à farmácia foi utilizado para aquisição de novos conhecimentos e consolidação das competências previamente adquiridas.

3.3.3 Formações externas

A constante inovação da área farmacêutica torna imperativa a atualização dos profissionais de saúde que exercem nesta área. Consequentemente, a formação contínua torna-se uma parte inerente e importante da profissão farmacêutica. As formações externas representam uma oportunidade de acréscimo ao conhecimento já adquirido. Durante o período de estágio, tive a oportunidade de assistir a duas formações externas, uma relativa a produtos e outra ao sistema Sifarma[®]. As formações relativas a produtos permitem aprofundar o conhecimento dos mesmos e, por isso, é possível realizar um aconselhamento mais personalizado, apresentando assim uma vantagem.

3.3.4 Valormed

A Valormed é uma sociedade sem fins lucrativos, criada em 1999, com a finalidade de realizar a gestão dos resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora de uso e de prazo de origem doméstica². Os contentores Valormed encontram-se disponíveis nas farmácias comunitárias, desta forma, o farmacêutico tem a responsabilidade de sensibilizar os seus utentes à adesão a esta iniciativa. Pode considerar-se que na FC esta tarefa foi concluída com sucesso por toda a equipa, visto que há uma necessidade regular de colocar novos contentores, contribuindo assim para a proteção da saúde pública.

3.4 Ameaças

3.4.1 Medicamentos esgotados

No decorrer do estágio, a dispensa de determinados medicamentos foi impossibilitada por estes se encontrarem esgotados, devido a falhas na distribuição grossista ou quebras na produção. Assim, este ponto representa uma ameaça, dado que se trata um problema com origens exteriores à farmácia, não é possível solucioná-lo internamente, nem ter uma previsão concreta de quando os medicamentos esgotados voltam a estar disponíveis.

O trabalho no *backoffice* no momento da realização e receção da encomenda releva a sua importância, especialmente nestas situações. O sistema Sifarma 2000[®] é o utilizado para a realização de encomendas, este, através dos dados cedidos pelos armazenistas, permite identificar os produtos que se encontram rateados e realizar uma encomenda destes, ainda que numa menor quantidade que o desejável, assegurando o acesso ao medicamento de forma mais limitada.

Esta realidade é limitante no momento do atendimento, devido à impossibilidade de dispensar o medicamento solicitado pelo utente. Apesar de a substituição por outro laboratório ser uma das hipóteses para a resolução do problema, alguns utentes são resistentes à mudança, devido ao hábito com certo laboratório, e declaram que preferem aguardar que este volte a estar disponível, levantando, assim, a problemática da falta de adesão à terapêutica. Noutros casos, não existe alternativa e é necessário proceder à alteração da prescrição terapêutica por parte do médico, sendo estes MSRM. Esta falha afeta todos os doentes, mas principalmente doentes com patologias crónicas e tratamento prolongado, aos quais não é possível dar resposta às suas necessidades.

3.4.2 Situação socioeconómica do país

A reflexão da situação económica atual do país é notória nas farmácias e em quem recorre às mesmas. As alterações económicas vividas, levaram à redução do poder de compra da população, afetando, juntamente com a variabilidade de comparticipação de medicamentos, negativamente as farmácias. Deste modo, existe a necessidade de inovação que diferencie a farmácia e beneficie o utente.

4. Considerações Finais

O estágio em farmácia comunitária permitiu-me colocar em prática os conhecimentos adquiridos aos logo do meu percurso académico, em contexto real, assim como também,

desenvolver outras competências, através das diferentes atividades desempenhadas e do contacto com o meio envolvente, que foram essenciais para o meu desenvolvimento e experiência a nível profissional e pessoal. Desta forma, posso concluir que este estágio curricular foi uma experiência bastante positiva e que representa uma mais-valia para o meu futuro profissional como farmacêutica.

Por último, gostaria de agradecer a toda a equipa da Farmácia Cortesão, por me ter acolhido tão bem, pela disponibilidade demonstrada para ajudar e pelos valores e ensinamentos transmitidos durante os quatro meses de estágio, que foram cruciais para o sucesso do mesmo.

5. Casos Práticos

Caso I

Utente do sexo feminino dirige-se à farmácia e expõe a situação do seu marido, um idoso de 74 anos que se queixa de dor de dentes e pede Brufen® 400 mg (ibuprofeno) para o alívio dos sintomas. Pergunto se o utente em questão tem ficha aberta no sistema da farmácia, ao que a senhora responde que sim.

Após abrir a ficha, deteto que o utente toma Eliquis® 5 mg³, que tem como princípio ativo o apixabano um anticoagulante oral que inibe diretamente o fator Xa da cascata da coagulação, deste modo a utilização de um AINE não é aconselhável, pois existe um risco acrescido de hemorragia pela toma em simultâneo com um anticoagulante oral e pela idade do senhor.

Assim, acabei por dispensar um Ben-u-ron® 500 mg (paracetamol) que tem indicação terapêutica para odontalgias ligeiras a moderadas e apresenta ser a solução mais segura neste caso.

Caso II

Utente do sexo feminino, 68 anos, recorre à farmácia queixando-se de tosse seca e persistente. Após consultar a ficha da utente, apercebo-me que já havia alguns tratamentos para esta afeição que não tiveram efeito. Sendo uma doente hipertensa, tinha na sua medicação habitual a combinação de Perindopril + Indapamida 4 mg + 1,25 mg. Sabendo que os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) podem originar tosse seca⁴, a utente foi aconselhada a consultar o seu médico para revisão da prescrição.

Quando a utente voltou à farmácia, apresentou uma nova receita do seu cardiologista, houve alteração da medicação para a hipertensão arterial para Losartan + Hidroclorotiazida 50 mg + 12,5 mg e não apresentava tosse.

Caso III

Utente do sexo feminino, 43 anos, dirige-se à farmácia referindo que sente comichão e ardor na zona íntima. Questiono se tem corrimento anormal e esbranquiçado, ao que a utente responde que sim. Estes sintomas são típicos de uma candidíase vaginal, provocada, na maior parte dos casos, pelo fungo *Candida albicans*, que se encontra naturalmente na flora da zona íntima.

Tratando-se de uma infeção fúngica, a utilização de um produto com clotrimazol, substância ativa classificada como antifúngico e que é de uso tópico, é o mais indicado nestes casos. Deste modo, o produto dispensado foi o Gino-Canesten^{®5}, um creme vaginal que tem como princípio ativo a substância anteriormente referida, com as indicações de aplicação do creme 2 a 3 vezes ao dia, durante uma semana.

A alteração do pH da zona íntima é um dos fatores desencadeantes da Candidíase, desta forma, como adjuvante à terapêutica aconselhei um gel de limpeza íntimo, que iria ajudar a manutenção do pH ligeiramente ácido da zona íntima. O produto escolhido foi Lactacyd[®] Pharma Suavizante, indicado para este tipo de infeções. O extrato de Margaridas Azuis e o Aloe Vera presentes na formulação do produto, proporcionam uma sensação de conforto da mucosa, aliviando a sensação de comichão e ardor⁶.

Caso IV

Utente do sexo masculino, com cerca de 20 anos, apresenta-se na farmácia com dor e alguma irritação na garganta. Pede pastilhas para o alívio dos sintomas. Tendo em consideração as opções disponíveis, dispenseo Tantum Verde[®] Pastilhas 3 mg + 2,5 mg⁷. Esta formulação contém cloridrato de benzidamina, que tem ação anti-inflamatória local e anestésica local e benzocaína que é um anestésico de aplicação tópica local, que reforça o efeito da benzidamina. As indicações dadas neste caso foram a toma de uma pastilha até 3 vezes ao dia, durante o máximo de sete dias.

Caso V

Utente do sexo feminino, cerca de 30 anos, recorre à farmácia pois apresenta pequenas vesículas em redor dos seus lábios. Após questionar se sente dor, responde que não, mas que tem a sensação de formigueiro naquela zona. A utente referiu também que costuma ter herpes labial.

O herpes labial caracteriza-se pelo aparecimento de pequenas bolhas com líquido nos lábios e em redor dessa zona, que mais tarde rompem, formando uma crosta que cai depois de uns dias. Este processo, pode ocorrer ao longo de toda a vida, após contacto com o vírus, com periodicidade variável. Considerando toda a informação, o produto aconselhado foi o creme Zovirax[®].

A substância ativa deste produto é o aciclovir, um antiviral com ação contra os vírus herpes simplex (VHS)⁸, responsáveis pelo aparecimento do herpes labial. Assim, este produto foi dispensado sob as seguintes indicações: aplicar o creme nas lesões 5 vezes ao dia durante quatro dias.

6. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **BOAS PRÁTICAS DE FARMÁCIA COMUNITÁRIA**. (2015).
2. **Quem somos - Valormed Institucional**. (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://valormed.pt/quem-somos/>
3. INFARMED, I.P. – **RESUMO DAS CRACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO: Eliquis 5 mg Comprimidos Revestidos por Película**. (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/eliquis-epar-product-information_pt.pdf
4. INFARMED, I.P. – **RESUMO DAS CRACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO: Perindopril + Indapamida 4 mg + 1,25 mg Comprimido**. (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
5. **Gino-Canesten creme vaginal | Canesten** - (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.antifungicos.bayer.pt/produtos/saude-intima-feminina/gino-canesten-creme-vaginal>
6. **Lactacyd® Pharma Suavizante | Lactacyd®** - (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.lactacyd.pt/product/lactacydr-pharma-suavizante>
7. **Tantum | Verde Pastilhas Clássicas** - (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.tantum.pt/area-de-saude/dor-de-garganta/tantum-verde-pastilhas-3mg-2-5mg>
8. INFARMED, I.P. - **RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO: Zovirax 50 mg/g Creme**. (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

Parte II

Relatório de Estágio INFARMED, I.P.



Orientador: Dra. Dina Lopes

Lista de Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

DAM – Direção de Avaliação de Medicamentos

EM – Estados-Membros

EME – Estados Membro Envolvidos

EMR – Estado Membro de Referência

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

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SEAM – Sistema Europeu de Avaliação de Medicamentos

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TAIM – Titular de AIM

UMM – Unidade de Manutenção no Mercado

1. Introdução

A última etapa do percurso no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é marcada pela realização do estágio curricular no 2º semestre do 5º ano. A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra possibilita a realização do mesmo em diferentes áreas do setor farmacêutico. A área dos assuntos regulamentares despertou o meu interesse ao longo do plano de estudos do MICF devido à importância do farmacêutico em todas as etapas do medicamento. Desta forma, escolhi o Infarmed para a realização do estágio curricular, na área acima referida, devido à sua importância e excelência como entidade reguladora.

A Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM) foi a unidade orgânica que me acolheu durante os três meses de estágio, mais concretamente a Unidade de Manutenção no Mercado (UMM).

O presente relatório tem como objetivo a análise crítica do estágio curricular, realizado sob a orientação da Dra. Dina Lopes. A análise é feita através do modelo SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), permitindo assim a análise interna (Pontos Fortes e Pontos Fracos) e a análise externa (Oportunidades e Ameaças) (Tabela I).

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

O Infarmed é um instituto público, fundado em 1993. Tendo participação no novo Sistema Europeu do Medicamento⁹. Atualmente, encontra-se no Parque de Saúde de Lisboa e está integrado na administração indireta do Estado, sendo dotado de autonomia administrativa, financeira e património próprio. Tem como missão principal a regulação e supervisão dos setores do medicamento de uso humano e produtos de saúde (cosméticos, dispositivos médicos e produtos de higiene corporal), de modo a garantir que estes são de qualidade, seguros e eficazes¹⁰.

A estrutura organizacional do Infarmed encontra-se dividida em cinco órgãos e catorze unidades orgânicas, de acordo com área em que se integram (atribuição ou gestão), como se verifica no organograma apresentado (Figura I)¹¹.

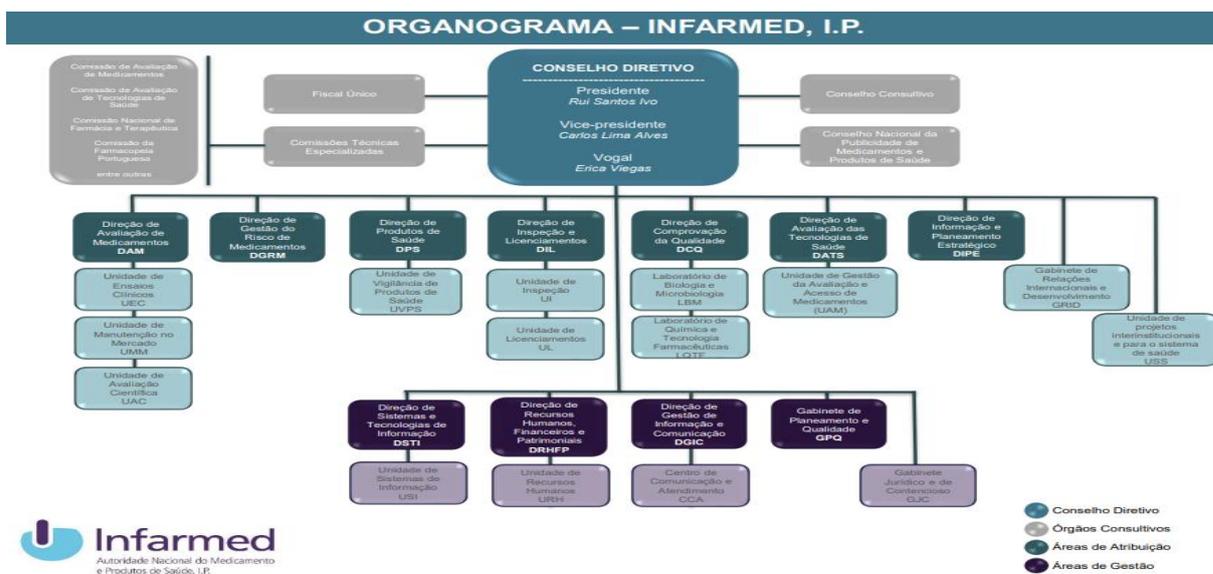


Figura I: Organograma do INFARMED, I.P.

3. Direção de Avaliação de Medicamentos

A Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM) é uma das unidades orgânicas que desempenha funções no Infarmed. As atividades desempenhadas nesta unidade têm como objetivo assegurar os procedimentos de registo, avaliação da sua eficácia, segurança e qualidade, e de autorização de introdução no mercado de medicamentos de uso humano e à sua manutenção no mercado¹², entre outros.

Sob a direção da Dra. Marta Marcelino, a DAM encontra-se dividida em três subunidades especializadas por áreas de intervenção: A Unidade de Ensaios Clínicos (UEC), a Unidade de Avaliação Científica (UAC) e a Unidade de Manutenção no Mercado (UMM)¹². Durante o meu estágio na DAM, fui inserida na equipa da UMM que realizava a gestão de processos de alterações aos termos da Autorização de Introdução no Mercado (AIM) concedida por procedimento descentralizado e de reconhecimento mútuo, sendo Portugal o Estado Membro de Referência.

Os processos trabalhados na UMM encontram-se na fase pós-AIM, desta forma, as tarefas atribuídas no período de estágio, consistiam em avaliar pedidos de renovações ou alterações de AIM, e, posteriormente, aprovar ou indeferir os mesmos. Para proceder à validação destes processos, era necessário cruzar a informação enviada pelos requerentes, através de uma plataforma própria, com uma *checklist* pré-definida. Após a avaliação destes dados, era possível averiguar se os processos poderiam ser aprovados.

4. Análise SWOT

Tabela I: Análise SWOT

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none">• Formação inicial• Contacto com o ritmo de trabalho em Assuntos Regulamentares• Autonomia de trabalho• Plataformas eletrónicas internas	<ul style="list-style-type: none">• Duração do estágio• Interação com outras Direções do INFARMED
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none">• Portugal como Estado Membro de Referência• Inglês técnico	<ul style="list-style-type: none">• Pedidos de avaliação incompletos submetidos pelos TAIM• Invalidações de processos por outros Estados-Membros• Recursos humanos

4.1 Pontos Fortes

4.1.1 Formação inicial

O estágio foi iniciado com um conjunto de formações específicas que permitiram a aquisição e consolidação de conhecimentos na área regulamentar, como também a perceção da dinâmica de trabalho da DAM. Estas formações, realizadas ao longo da primeira semana de estágio, foram essenciais para a criação de bases de trabalho a aplicar posteriormente em contexto real, sobretudo a explicação de como se deveria proceder o uso das plataformas eletrónicas internas do Infarmed. Porém, apenas com a prática e com as diferentes necessidades ao longo do período de estágio foi possível ter uma perceção mais concreta dos diferentes passos necessários para a validação de processos. As formações iniciais apresentaram-se como um ponto forte do meu estágio, pois a informação transmitida, quando conjugada com a prática, possibilitou a realização de tarefas com eficiência.

4.1.2 Contacto com o ritmo de trabalho em Assuntos Regulamentares

A unidade curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento, lecionada no plano de estudos do MICEF, concede bases essenciais para a realização de trabalhos nesta área, no

entanto, estas apresentam-se numa componente mais teórica. A realização de estágios na área dos assuntos regulamentares permite a aplicação prática dos conhecimentos adquiridos. Deste modo, considero o contacto com o dia a dia da UMM um ponto forte.

Os Regulamentos, Normas Orientadoras, Diretivas e Decretos-Lei inerentes à legislação do medicamento, são a base de trabalho das autoridades regulamentares, categoria onde se insere o Infarmed. Assim, a validação de processos de renovações e alterações aos termos de AIM é baseada na conformidade com a legislação em vigor. Os processos com os quais tive contacto no decorrer do estágio, apresentavam características distintas entre si, desta forma foram surgindo dúvidas variadas, que permitiram o contacto constante com a legislação, tornando a experiência mais diversificada e que, no final, culminaram na evolução de conhecimentos na área de assuntos regulamentares, que poderão ser úteis no futuro profissional como farmacêutica.

4.1.3 Autonomia de trabalho

Após a fase inicial de adaptação às diferentes ferramentas de trabalho, o estagiário é incentivado a realizar as tarefas propostas de forma autónoma e responsável, uma vez que, as tarefas realizadas impactavam diretamente a informação, relativa a medicamentos, cedida não só a outros profissionais de saúde, mas também ao público geral. Desta forma, a compreensão e execução de forma correta de todas as etapas de validação de processos é fulcral para um bom desempenho. A atribuição de credenciais individuais para acesso às plataformas eletrónicas internas, permite a consulta de toda a informação necessária para a realização de tarefas autonomamente. Apesar de a autonomia de trabalho ser incentivada, a equipa da UMM mostrou-se sempre disponível para esclarecer as diversas dúvidas que iam surgindo, tornando o ritmo de trabalho fluído e permitindo a superação de dificuldades e o desenvolvimento de competências.

4.1.4 Plataformas eletrónicas internas

A rede interna composta pelas diferentes plataformas eletrónicas de trabalho do Infarmed facilita a partilha de informação entre estas, assim como, a organização e o fácil acesso à informação quando necessário. Como a quantidade de dados trabalhados é elevada, este apresenta-se como um ponto forte. Estas plataformas são essenciais para o funcionamento normal das funções diárias desempenhadas pelas diferentes unidades de trabalho do Infarmed e, por isso, é essencial a sua utilização de uma forma correta.

Durante o meu percurso pela UMM, trabalhei com algumas destas plataformas, nomeadamente o CTS (*Communication and Tracking System*), o SGA (Sistema de Gestão de Avaliações) e o GiMed (Gestão de Informação de Medicamentos). O SGA permite a gestão da informação submetida pelo titular de AIM através da plataforma SMUH-ALTER (Sistema de Medicamentos de Uso Humano – Alterações). O contacto diário com estas plataformas permitiu-me compreender melhor a sucessão de etapas envolvidas na validação de processos e ainda trabalhar com as ferramentas que permitem a realização do trabalho de excelência apresentado pelo Infarmed.

4.2 Pontos Fracos

4.2.1 Duração do estágio

A UMM é composta por diferentes departamentos que desempenham tarefas em diversas vertentes do pós-AIM. Desta forma, a realização de um estágio de apenas três meses acaba por não ser suficiente para experienciar a realidade profissional de um gestor de processos da UMM na sua totalidade.

Dado o curto período de estágio, não foi possível contactar com todo o tipo de processos geridos pela UMM. Os processos com os quais tive mais contacto, foram as renovações de AIM reduzidas que possuem um calendário estipulado de 30 dias, assim, foi possível acompanhar este tipo de processos desde a sua validação inicial até ao final de calendário e posterior finalização. Outro tipo de processos que apresentavam alguma exigência adicional no momento da validação ou que a duração do seu calendário não permitia a conclusão do processo dentro do tempo de estágio, não chegaram a ser alvo de trabalho. Assim sendo, não foi possível ter contacto com todas as tipificações de alterações, tendo apenas validado alterações do tipo IB.

Apesar de o conhecimento adquirido ter sido enriquecedor, a duração do estágio foi, a meu ver, um ponto fraco do mesmo, visto que não foi possível experienciar todo o tipo de processos geridos pela UMM, nomeadamente as alterações do tipo IA e tipo II e as renovações complexas.

4.2.2 Interação com outras Direções do INFARMED

Associado ao ponto anteriormente descrito, a curta duração do período de estágio no Infarmed impossibilitou o contacto com outras direções que operam na autoridade regulamentar e, assim, esta limitação revelou-se um ponto fraco do estágio, uma vez que não

foi possível ter a percepção global de todas as funções desempenhadas pelas diferentes direções e o papel do farmacêutico na execução das diversas atividades.

4.3 Oportunidades

4.3.1 Portugal como Estado Membro de Referência

A participação significativa e ativa do Infarmed no Sistema Europeu de Avaliação de Medicamentos (SEAM) permitiu consolidar a atuação de Portugal como Estado Membro de Referência (EMR)¹³. Em 2018, o Infarmed encontrava-se no 3.º lugar dentro dos Estados-Membros (EM) que mais contribuíram para o SEAM¹⁴. O rigor e excelência apresentados na emissão de pareceres técnico-científicos, permite a conclusão dos processos submetidos com distinção, colocando Portugal num posicionamento favorável relativamente a outros EM.

O reconhecimento que leva Portugal à sua atual posição representa uma oportunidade para a continuação da aposta das competências técnico-científicas de análise do Infarmed, que levam a que os requerentes escolham Portugal como EMR na submissão de processos europeus de AIM.

4.3.2 Inglês técnico

A área farmacêutica exige o contacto constante com outras nacionalidades, especialmente na área dos assuntos regulamentares. Durante o período de estágio, a utilização da língua inglesa foi praticamente diária, quer na comunicação com os titulares de AIM, quer na revisão de textos da informação do medicamento e, também, de outros documentos necessários para a validação de processos. Assim, tive a oportunidade de adquirir e consolidar conhecimentos técnico-científicos de inglês, destacando o uso de termos da área regulamentar que não têm uma tradução adequada para o português, constituindo esta vertente uma vantagem pessoal e como futura profissional de saúde.

4.4 Ameaças

4.4.1 Pedidos de avaliação incompletos submetidos pelos TAIM

Os pedidos de avaliação de alterações de AIM e renovações, submetidos pelos titulares, devem cumprir um conjunto de requisitos e conter informação própria consoante o tipo de pedido. Foi possível verificar que muitas vezes os pedidos submetidos encontram-se incompletos ou com erros na documentação necessária, sendo necessário solicitar ao titular de AIM a informação em falta, prolongando o tempo de validação do processo. Deste modo,

este ponto pode traduzir-se numa ameaça, na medida em que pode deixar de ser possível acompanhar o processo até à sua finalização, devido ao tempo decorrido entre o pedido da informação e a resposta do TAIM, considerando o curto período de estágio.

4.4.2 Invalidações de processos por outros Estados-Membros

Em certos casos, após a validação e aprovação de toda a informação necessária para dar seguimento aos processos, no momento de iniciar calendário no CTS, plataforma que permite a comunicação entre os EM envolvidos nos processos, havia invalidações de alguns dos Estados Membros Envolvidos (EME), o que impossibilitava a continuidade do processo em causa. Nesta situação, é necessário comunicar diretamente com os EM, via *e-mail*, questionando se as questões de invalidação se encontram resolvidas. Este processo poderia prolongar o tempo do processo, pois, por vezes, os tempos de espera de resposta eram longos. Este ponto surge como uma ameaça, dada curta duração do estágio, poderia não ser possível acompanhar o processo até ao fim.

4.4.3 Recursos humanos

No decorrer do estágio, foi possível ter a perceção de como a falta de recursos humanos vivenciada na DAM afeta o ritmo de trabalho. A falta de profissionais levou à acumulação de tarefas, inviabilizando a capacidade de resposta de acordo com o objetivo do calendário estabelecido. Assim, a análise de processos foi afetada, levando a tempos de espera longos até à finalização dos processos submetidos ao Infarmed.

A falta de recursos humanos constitui uma ameaça, não apenas na dimensão dos estágios, mas também no posicionamento externo do Infarmed como entidade reguladora.

5. Considerações Finais

A oportunidade de realizar o estágio curricular no INFARMED I.P. foi uma experiência bastante positiva, que contribuiu para a minha aprendizagem e crescimento, a nível pessoal e profissional. A orientação da equipa da DAM foi fundamental para o sucesso do estágio, quer pela transmissão de valores e conhecimentos, quer pela disponibilidade constante para esclarecer dúvidas.

A aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo do curso, em contexto real, foi possível durante o período de estágio, destacando as unidades curriculares de Assuntos Regulamentares do Medicamento e Gestão de Processos Regulamentares. As bases que estas duas unidades curriculares me proporcionaram, na área dos assuntos regulamentares, facilitaram a minha adaptação ao ritmo de trabalho da UMM.

Por fim, posso concluir, que foi uma experiência bastante enriquecedora e gratificante que me permitiu adquirir competências e conhecimentos técnicos que serão úteis no meu futuro profissional e compreender melhor o papel do farmacêutico na área dos assuntos regulamentares.

6. Bibliografia

1. INFARMED, I.P. - Cronologia – (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed//cronologia>

2. INFARMED, I.P. - O Infarmed – (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao>

3. INFARMED, I.P. - Estrutura e organização – (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao>

4. DAM - INFARMED, I.P. – (Consultado a 8 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/dam>

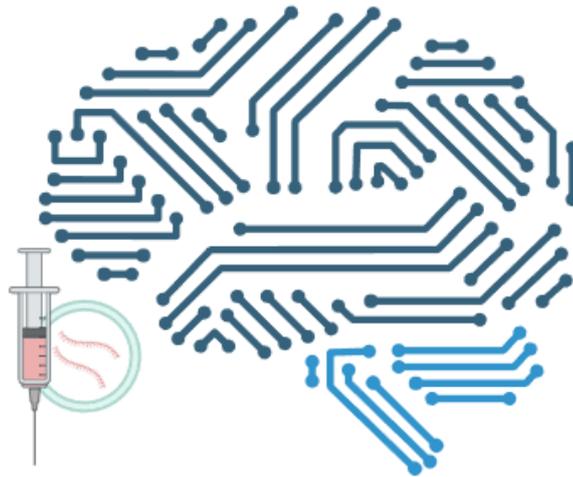
5. EVOLUÇÃO DE PORTUGAL E DO INFARMED – (Consultado a 9 de agosto de 2023). Disponível na internet: https://www.infarmed.pt/documents/15786/1228470/38_Estado_Membro_Ref.pdf/a79a558a-a317-43a3-96a3-42657d1c5cd0?version=1.0

6. SNS – Infarmed no Top 3 Europeu – (Consultado a 9 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2019/05/14/infarmed-no-top-3-europeu/>

Parte III

Monografia

“Inteligência Artificial no desenvolvimento de vacinas mRNA para o tratamento do cancro”



Orientador: Professor Doutor João Nuno Moreira

O trabalho de revisão bibliográfica - Monografia - teve o apoio do projeto CInTech - Technological Hub for Innovation, Translation and Industrialization of Complex Injectable Drugs -, com a referência n.º C644865576-00000005, co-financiado pela Componente C5 - Capitalização e Inovação Empresarial integrada na Dimensão Resiliência do Plano de Recuperação e Resiliência (PRR), através do fundo NextGenerationEU.



ABSTRACT

The use of RNA molecules for gene therapy has several advantages due to the different functions that these molecules perform *in vivo*. The study of the structure of messenger RNA (mRNA) molecules and the mechanisms they trigger in the extracellular and intracellular environment, allowed us to understand how these molecules can be modified to generate the expression of a protein of interest, which will play an essential role in therapy. mRNA vaccines have gained prominence in this type of therapy in recent years, having shown interest in their application in cancer immunotherapy, particularly in solid tumors due to the immunomodulatory action induced in the environment surrounding these tumors. The development of quality and effective mRNA vaccines requires the treatment of some factors such as: the delivery vehicle for the mRNA molecules, which needs to be able to overcome extracellular and intracellular barriers, to guarantee the correct expression of the desired proteins and the personalization of therapy for each patient, as well as ensuring the safety of its administration.

Autonomous artificial intelligence systems (Machine Learning and Deep Learning) have been applied to develop mRNA vaccines. The information processing carried out allowed the optimization of therapy, and these systems were put into practice by the pharmaceutical industry. Studies carried out allowed us to conclude that these models can be applied in personalizing treatment, choosing the delivery vehicle, as well as predicting toxicity after administration, this is possible with robust databases of the subject to be analyzed.

Throughout this paper, I will be focusing on mRNA therapies applied to cancer treatment and how artificial intelligence models can help in the optimization of these vaccines. Highlighting the models under study, their advantages, limitations and future prospects.

Keywords: mRNA vaccine, Immunotherapy, Artificial Intelligence, Machine Learning, Deep Learning.

RESUMO

A utilização de moléculas de RNA para terapia genética apresenta diversas vantagens devido às diferentes funcionalidades que estas moléculas desempenham *in vivo*. O estudo da estrutura das moléculas de RNA mensageiro (mRNA) e dos mecanismos que estas desencadeiam no meio extracelular e intracelular, permitiu a compreensão da forma como estas moléculas podem ser modificadas para gerarem a expressão de uma proteína de interesse, que terá um papel importante na terapêutica. As vacinas mRNA ganharam destaque neste tipo de terapias nos últimos anos, tendo revelado interesse a sua aplicação na imunoterapia do cancro, nomeadamente em tumores sólidos devido à ação imunomoduladora induzida no ambiente envolvendo os mesmos. O desenvolvimento das vacinas mRNA com qualidade e eficazes, requer o tratamento de alguns fatores como: o veículo de entrega das moléculas mRNA, que precisa de ser capaz de transpor as barreiras extracelulares e intracelulares, de modo a garantir a expressão correta das proteínas desejadas e a personalização da terapia para cada doente, assim como também garantir a segurança da sua administração.

Os sistemas de inteligência artificial autónomos (*Machine Learning* e *Deep Learning*) foram aplicados no desenvolvimento de vacinas mRNA. O processamento da informação realizado permitiu a otimização da terapêutica, tendo estes sistemas sido colocados em prática pela indústria farmacêutica. Estudos realizados permitiram concluir que estes modelos podem ser aplicados na personalização da terapêutica, escolha do veículo de entrega, assim como também, na previsão de toxicidade após a administração, isto é possível com bases de dados robustas da matéria a analisar.

Ao longo deste trabalho, irei basear-me nas terapêuticas mRNA aplicadas ao tratamento na área do cancro e como os modelos de inteligência artificial podem ajudar na otimização das mesmas, incidindo nos modelos em estudo, as suas vantagens, limitações e perspetivas futuras.

Palavras-chave: Vacina mRNA, Imunoterapia, Inteligência Artificial, *Machine Learning*, *Deep Learning*.

Lista de Abreviaturas

AAT – Antígenos Associados a Tumores

AET – Antígenos Específicos de Tumores

ANN – *Artificial Neural Network*

AT – Antígenos Tumorais

CD – Células Dendríticas

DL – *Deep Learning*

HLA – *Human Leukocyte Antigen* – Antígeno Leucocitário Humano

IA – Inteligência Artificial

ICIs – Inibidores dos *immune checkpoint*

mAb – Anticorpos Monoclonais

MHC – Moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade

ML – *Machine Learning*

MPRAs – *Massively Parallel Reporter Assays*

MRL – *Mean Ribosome Loading*

NPL – Nanopartículas Lipídicas

ORF – *Open Reading Frame*

PCD – *Polymer Component Distribution*

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

PEG – Polietilenoglicol

SERS – *Surface-enhanced Raman spectroscopy*

TIV – Transcrição *in vitro*

UTR – *Untranslated Region* – Região não codificante

I. Introdução

O cancro representa um grupo de doenças que podem começar em qualquer órgão ou tecido do corpo, quando células proliferam descontroladamente e invadem outras partes do corpo e/ou se espalham para outros órgãos. O processo mais tardio da doença é denominado metástase, sendo a segunda principal causa de morte no mundo¹. O tratamento do cancro assenta frequentemente na cirurgia, radioterapia e quimioterapia, mas surgiram outros métodos, como a imunoterapia e terapia personalizada que revolucionaram e acabaram por complementar as abordagens anteriormente utilizadas². A imunoterapia tem como objetivo potenciar ou restaurar a capacidade do sistema imunitário de detetar e eliminar células cancerígenas³, tirando partido dos componentes biológicos e fisiológicos presentes neste sistema, contudo, apenas uma pequena fração das mutações induz uma resposta imune no indivíduo portador do tumor, o que limita a imunoterapia para tumores com alta carga mutacional. A utilização de anticorpos monoclonais (mAb) como inibidores dos *immune checkpoint* (ICIs)⁴ surge como uma das abordagens com mais destaque da imunoterapia nos últimos anos. A terapia com ácidos nucleicos, nomeadamente, vacinas mRNA com o objetivo de aumentar a apresentação de antigénios associados a tumores (AATs) e antigénios específicos de tumores (AETs) ao sistema imunitário e iniciar a ativação de células T e B³, é uma das vertentes da imunoterapia que tem vindo a ganhar destaque devido ao potencial que o mRNA apresenta como agente terapêutico.

A molécula RNA mensageiro (mRNA) foi descoberta em 1961, no entanto, a primeira vacina mRNA testada para o tratamento do cancro surgiu apenas em 1995, em ensaios com murganhos^{5, 6}. No período temporal ocorrido entre os dois eventos, o estudo do mRNA permitiu perceber o papel desta molécula na síntese de proteínas e a possível aplicação desta descoberta na terapêutica, assim como o desenvolvimento de tecnologia capaz de levar o mRNA ao alvo terapêutico. Utilizando mRNA transcrito *in vivo*, que tem a capacidade de transportar a informação de qualquer gene, é possível a tradução de proteínas com a atividade farmacológica *in vivo* de interesse⁷. O progresso da nanotecnologia possibilitou sistemas de entrega à base de lípidos de mRNA, os lipossomas, tendo sido em 1978, a primeira entrega de mRNA a células utilizando lipossomas^{6, 8}. Os ácidos nucleicos apresentam carga negativa e são hidrofílicos impedindo a sua passagem pela membrana celular. As nanopartículas lipídicas desempenham um papel fulcral no transporte do mRNA até ao citoplasma das células-alvo, pois são catiónicas e hidrófobas e permitem uma melhor resistência à ação das ribonucleases (RNases), enzimas que catalisam a hidrólise de substratos de RNA⁹, melhorando assim a estabilidade do mRNA *in vivo*¹⁰.

A necessidade produção em larga escala de vacinas mRNA em 2021, para o combate da pandemia Covid-19, veio realçar as potencialidades e vantagens terapêuticas, que podem ser consideradas na aplicação deste tipo de terapêuticas no cancro, tais como – elevada eficácia, toxicidade baixa, administração segura, pois não é necessária integração no genoma não havendo risco de ocorrer mutações; podem ser fabricadas rapidamente e com custos reduzidos, relativamente à produção de completa proteínas. Em terapêuticas como a quimioterapia e a radioterapia pode ocorrer resistência a vários fármacos utilizados, assim como, toxicidade elevada. Contudo, as terapias à base de mRNA também apresentam algumas limitações que se tornam desafios a superar durante o desenvolvimento e produção, nomeadamente, a instabilidade e ineficácia na entrega *in vivo* do mRNA, a duração da expressão de proteínas e da imunomodulação e a entrega direcionada ao alvo *in vivo*^{7; 11}.

Com o progresso da tecnologia a nível global e sendo as diferentes áreas inerentes a esta cada vez mais indispensáveis no nosso dia a dia, é de notar, que no ramo da saúde, a tecnologia se tornou também uma peça fulcral para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamento. A necessidade de autonomizar procedimentos e torná-los mais eficientes, levou à introdução da Inteligência Artificial (IA) nesta área. A IA é o termo utilizado para o uso de *software* e *hardware* que mimetiza comportamento inteligente, com vista a realização de tarefas com o mínimo de intervenção humana¹². Assim, a utilização de modelos IA no desenvolvimento de vacinas mRNA para o tratamento do cancro é uma vertente que está atualmente a ser explorada pela indústria farmacêutica.

2. Antígenos tumorais

Os antígenos tumorais podem ser classificados em duas categorias: os antígenos associados a tumores (AATs) e antígenos específicos de tumores (AETs). Os AATs são expressos normalmente nos tecidos, enquanto que em células tumorais estes encontram-se expressos de forma não regulada. Assim, este tipo de antígeno tem baixa especificidade tumoral, imunogenicidade e apresentam elevada tolerância imunológica central¹³. Estas características culminam num desafio, quando se pretende desenvolver vacinas para o tratamento do cancro, pois como são autoantígenos as células B e T que reconhecem estes antígenos podem ter sido removidas pela tolerância imunológica central e periférica. Assim, ensaios clínicos com vacinas direcionadas para os AATs demonstraram que a resposta imune, quando detetada, não é significativa. Quando se consegue ter uma resposta significativa, existe o risco de ocorrerem danos colaterais em células normais, podendo causar toxicidade¹⁴. O

segundo tipo de antígenos tumorais são os AETs, nestes estão incluídos antígenos expressos por oncovírus, sendo que 10% dos casos de cancro a nível mundial são causados por uma infecção viral¹⁴ e os neoantígenos, que são formados através de mutações no genoma das células tumorais durante a carcinogénese. Como estes antígenos não são expressos por células saudáveis têm elevada especificidade tumoral, imunogenicidade e fraca tolerância imunológica central¹³, sendo, portanto, alvos ideais para os linfócitos T. As células T reconhecem as células tumorais e desencadeiam uma resposta imunológica adaptativa¹⁵.

Estudos realizados com milhares de sequências de RNA, para 18 tipos de tumores, demonstraram que existe uma correlação positiva entre o número de neoantígenos e a expressão de genes com atividade citotóxica das células T¹⁶. Os neoantígenos podem ainda ser divididos em 2 categorias, os “partilhados” que são comuns em diferentes doentes oncológicos, mas não estão presentes no genoma humano e os “personalizados” que são únicos relativamente a outros antígenos e são diferentes de doente para doente¹⁵.

3. Vacinas mRNA

A preparação de vacinas mRNA para administração requer – a preparação da molécula mRNA *in vitro* e um sistema de entrega capaz de levar o mRNA até ao alvo para ocorrer o efeito terapêutico.

3.1 mRNA

As moléculas de mRNA são transcritas a partir de moléculas de DNA no núcleo da célula eucariota e contêm a informação genética para produzir proteínas no citoplasma¹⁷. Quando o RNA se encontra recentemente transcrito do genoma pela RNA polimerase II (Pol II) denomina-se de pré-mRNA¹⁸, esta molécula contém regiões codificantes (exões) e regiões não codificantes (intrões), sendo necessária uma fase de maturação para formar mRNA¹⁷. Este processo consiste em 3 etapas: *5'-end capping*, processamento (*splicing*) e poliadenilação. A primeira fase começa durante a transcrição pela Pol II e envolve a intervenção de três enzimas RNA trifosfatase, RNA guaniltransferase e guanina-N7 metiltransferase. Após o *capping* a molécula de RNA contém uma guanosina N7-metilada na extremidade 5'¹⁹. Durante a etapa de *splicing*, ocorre a remoção dos intrões e a formação de RNA maduro, resultante da união dos exões. Este processo termina com a poliadenilação, etapa que consiste na clivagem da extremidade 3' e adição da cauda poli(A) nesta mesma extremidade. Este processo de maturação permite proteger a molécula de mRNA da degradação (*5'-end capping*) e a 3'-

cauda poli(A) contribui para a estabilidade¹⁷ e desempenha um papel importante na exportação da molécula de mRNA maduro do núcleo para o citoplasma da célula, onde poderá ser traduzido, pelos ribossomas, em proteínas¹⁸.

Na produção de vacinas mRNA, a transcrição *in vitro* (TIV) seguida das etapas 5' *capping* e poliadenilação na extremidade 3' visa recriar o processo natural do mRNA no citoplasma das células eucariotas^{20; 21}. No entanto, a síntese *in vitro* de mRNA, obtido a partir de plasmídeos com as sequências de DNA desejadas²², procura também reduzir a degradação, que pode ser gerada após a administração do mRNA exógeno e melhorar a estabilidade da molécula *in vivo*, assim como também assegurar a expressão das proteínas desejadas. Para estes efeitos são utilizadas as seguintes técnicas – 5' *cap* e a adição da cauda poli(A) à extremidade 3', tal como acontece no processo na célula eucariota, com o objetivo de prevenir a degradação da molécula por ação de exonucleases e melhorar a estabilidade da mesma (Figura 1). A incorporação de regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3' do mRNA, permite a tradução correta do antigénio desejado, que se encontra codificado na região *open reading frame* (ORF). Após a obtenção da molécula de mRNA, esta deve passar por um processo de purificação, para remover fragmentos de molde curtos, gerados através de falhas na transcrição^{20; 21; 22}.

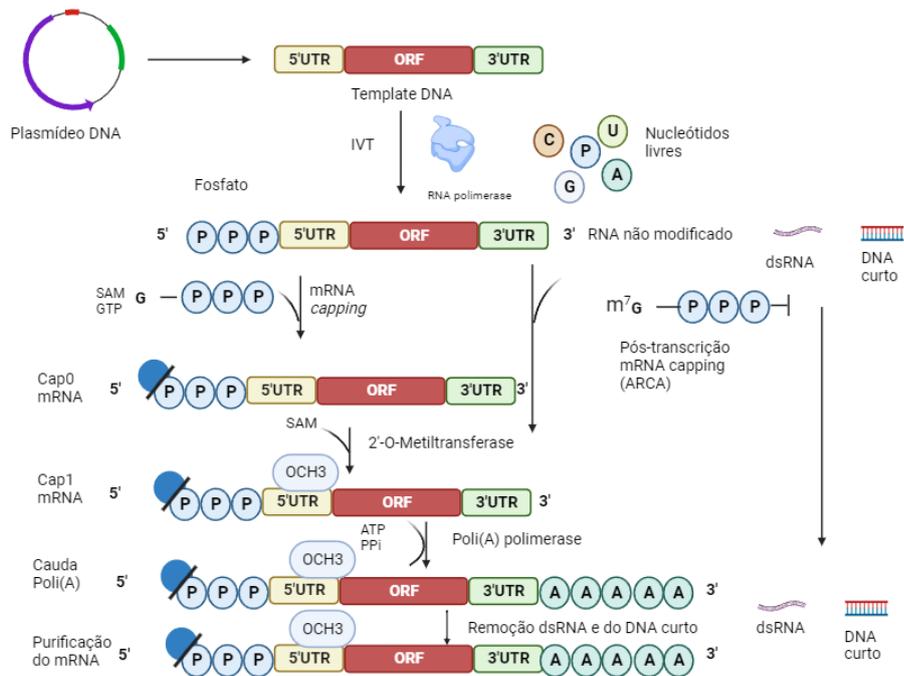


Figura I: Transcrição *in vitro* de mRNA

A técnica principal para preparar a molécula de mRNA a ser administrada nas vacinas, é a transcrição *in vitro*. É utilizada uma RNA polimerase bacteriófago, como, por exemplo, T3, T7 ou SP6 RNA polimerase e um molde de DNA linearizado que contém as sequências do antígeno alvo. O mRNA não-replicativo inclui uma open reading frame (ORF) que codifica a proteína de interesse. Possui também regiões não traduzidas (5'- e 3'- prime), uma guanossina N7-metilada na extremidade 5' e uma cauda poli(A) na extremidade 3', estas duas últimas podem ser adicionadas durante a transcrição *in vitro* ou adicionadas por enzimas depois da transcrição inicial¹³.

(Adaptado de Deng Z, Tian Y, Song J *et al.* 2022)

Imagem criada com Biorender.com

3.2 Sistemas de entrega *in vivo* de mRNA

Para surgir o efeito terapêutico desejado, as moléculas de mRNA têm de atingir o alvo, em concentração suficiente e de seguida, atravessar a membrana celular para chegar ao citoplasma e poder ocorrer a tradução de proteínas. Contudo, como foi anteriormente mencionado, existem alguns fatores que podem levar à instabilidade e degradação do mRNA impedindo o cumprimento do seu propósito. As barreiras extracelulares, como as exonucleases e as RNases presentes na pele e na corrente sanguínea e as próprias membranas celulares representam o primeiro desafio; após entrarem para o citoplasma as moléculas de mRNA ficam expostas às barreiras intracelulares, nomeadamente, endonucleases e lisossomas^{21; 23}. A endocitose é necessária para a entrada das moléculas mRNA na célula através da membrana celular. A fuga endossomal é o processo em que a nanopartícula, contendo o mRNA, sai de dentro do endossoma durante o processo de endocitose, que pode ocorrer por diversos mecanismos e levar à libertação prematura do mRNA, sendo, portanto,

alvo de estudo para a entrega deste tipo de material genético dentro do citoplasma das células. Quando a fuga endossomal ocorre no momento certo, o mRNA será traduzido na proteína desejada²⁴. No interior da célula, as moléculas de mRNA podem ser reconhecidas pelos recetores *toll-like* (RTL), TLR3 e TLR7, estes ligam-se ao mRNA e desencadeiam uma resposta imune inflamatória, que resulta na inibição da tradução de proteínas^{23; 25}.

A injeção de mRNA livre não otimizado – mRNA sem veículo de entrega – permitiu perceber que é capaz de despertar a resposta imune e induzir a libertação de citocinas²⁶, sem gerar efeitos secundários significativos, sendo, por isso, alvo de estudo para vacinação. O mRNA livre é mais suscetível a ser degradado pelas RNases, apesar destes obstáculos poderem ser minimizados através da realização de uma administração local de mRNA (intramuscular, intradermal, intranasal) que diminuem o contacto com as enzimas da corrente sanguínea²⁷, a utilização de veículos permite uma maior proteção das moléculas contra as barreiras encontradas e podem ajudar no processo de endocitose.

A utilização de peptídeos, como as protaminas (proteínas nucleares ricas em arginina e de pequena massa molecular²⁸) para entrega *in vivo* de mRNA demonstrou que apesar de possibilitar diminuir a suscetibilidade da degradação do mRNA pelo meio envolvente, o complexo mRNA-protamina não foi eficaz na tradução para proteínas^{23; 29}. Deste modo, outras tecnologias como polímeros e nanopartículas lipídicas (NPLs) começaram a ser utilizadas para a entrega de mRNA.

Os veículos à base de polímeros catiónicos, à semelhança das protaminas, também protegem o RNA da degradação por ação das RNases³⁰. Classificam-se como polímeros catiónicos polieterimida (PEI), poliamidoamina (PAMAM) e polissacarídeos³¹. Apesar de demonstrarem eficácia na entrega de ácidos nucleicos, através da concretização da fuga endossomal, estes polímeros podem desencadear toxicidade, nomeadamente, apoptose celular, necrose e inflamação^{32; 33}. Assim, NLPs são o veículo mais utilizado para a entrega *in vivo* de mRNA, devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade³⁴. As nanopartículas lipídicas são compostas por um lípido ionizável, um fosfolípido, colesterol e um polietilenoglicol (PEG)³⁵. Os materiais lipídicos ionizáveis podem ser carregados positivamente até um certo valor de pH, característica que favorece a encapsulação das moléculas mRNA através de interações eletrostáticas, pois estas têm carga negativa³⁶. Durante o processo de endocitose, os lípidos catiónicos interagem com a membrana aniónica dos endossomas, o que leva à formação de uma disrupção na bicamada, que leva à libertação do mRNA para o citoplasma³⁷. A via de administração escolhida tem influência na eficácia na distribuição e expressão proteica. Estudos realizados demonstraram que as injeções locais - intramuscular, intradermal e

intranasal – levam à infiltração de células apresentadoras de antígeno (APCs), o que estimula a expressão local e prolongada do antígeno pretendido^{24;38}. Por outro lado, a via intravenosa, apesar de permitir um maior volume de injeção e ter acesso direto a APCs e órgãos linfoides, apresenta o risco de toxicidade através de uma reação sistêmica³⁹.

3.3 Adjuvantes

A utilização de adjuvantes na formulação de uma vacina, tem como objetivo a atração das células do sistema imunitário para o local da injeção e a ativação das APCs⁴⁰. Os agonistas dos receptores *toll-like* dos nódulos linfáticos mostraram ter uma relação direta entre a resposta das células T CD8+ e a quantidade de agonistas dos RTL acumulados na drenagem dos nódulos linfáticos. Atualmente, os agonistas dos RTL estão em estudo como possíveis adjuvantes para vacinas contra o cancro^{41; 42}.

3.4 Vacinas mRNA na imunoterapia do cancro

As vacinas de mRNA são sintetizadas *in vitro*⁴³ têm interesse na imunoterapia do cancro, pois têm a capacidade de induzir a transcrição de proteínas que podem ser utilizadas para o tratamento, através da codificação de um ou mais antígenos associados a tumores (AATs) ou antígenos específicos de tumores (AETs) no citoplasma da célula hospedeira, sendo estes, depois, expressos nos antígenos alvo. Os AATs e AETs expressos podem ser apresentados à superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs) por moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC)⁴¹. Deste modo, podem gerar respostas imunológicas potentes, através de componentes celulares e humorais e eliminar células malignas².

A utilização deste tipo de vacinas nesta patologia pode ocorrer em dois tipos de estratégias: prevenção e tratamento. A primeira tem como objetivo induzir a memória do sistema imunitário, através da administração das vacinas em indivíduos saudáveis de modo a prevenir a doença, quando causada por vírus. Contudo, nem todos os tipos de cancro podem ser evitados com vacinas de prevenção. A utilização destas vacinas na terapêutica do cancro, prevê o tratamento da doença pelo potenciamento ou reativação do sistema imunitário⁴⁴. Atualmente, empresas como a Moderna[®], BioNTech[®] e a CureVac[®] são pioneiras em estudos de vacinas mRNA transcritas *in vitro*⁴³.

As vacinas de ácidos nucleicos contêm antígenos codificados por DNA e RNA. Estas vacinas permitem administrar vários antígenos em uma única dose e têm a capacidade de induzir uma forte resposta imunológica⁴⁴. Existem 4 tipos de vacinas aplicadas na terapia do

cancro, tendo estas como base: células, vírus, peptídios de antígenos do tumor ou ácidos nucleicos⁴⁴. Na última categoria de vacinas referenciada, encontram-se as vacinas de DNA e RNA. Atualmente, existem 3 tipos de RNAs em estudo para vacinas contra o cancro, sendo esses: mRNA não-replicativo e não-modificado, mRNA modificado e mRNA auto-amplificador derivado de vírus⁴¹.

A administração *ex vivo* de mRNA utilizando células dendríticas pode ocorrer através de eletroporação. A técnica consiste no aumento da permeabilidade da membrana celular através de um campo elétrico para facilitar a entrada do ácido nucleico, que irá codificar o antígeno anti-tumoral, no meio intracelular. Após este passo a célula dendrítica volta a ser administrada no doente, apresentando os antígenos aos linfócitos gerando uma resposta imune contra o tumor^{45; 46; 47}.

3.4.1 Mecanismos de ação das vacinas mRNA

A ativação da resposta imune inata e adaptativa é conseguida pela capacidade que as moléculas de RNA têm de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, IFN- γ e TNF- α)⁴⁸, assim como a secreção de interferões tipo I (INF- α e INF- β) e quimiocinas^{49; 50}. As vacinas à base de mRNA representam uma abordagem que utiliza antígenos tumorais do doente ou alogénicos para produzir as vacinas, permitindo a personalização das mesmas de acordo com as mutações de cada doente. Para estimular a resposta do sistema imunitário contra o tumor, as moléculas de mRNA podem ser modificadas, através da introdução de citocinas, quimiocinas e genes de moléculas co-estimuladoras ou silenciando genes imunossupressores⁴⁴. As células dendríticas (CD) são as mais eficazes na apresentação de antígenos, sendo, por isso, necessárias na vacinação para apresentarem antígenos tumorais⁴³. Este tipo de células possui a capacidade de internalizar antígenos e apresentá-los aos linfócitos T CD8+ e CD4+ através dos complexos MHC classe I e MHC classe II desencadeando uma resposta imune adaptativa⁵¹ (Figura II). Uma resposta mediada por anticorpos (humoral) é também conseguida pelas CDs quando apresentam antígenos aos linfócitos B⁵².

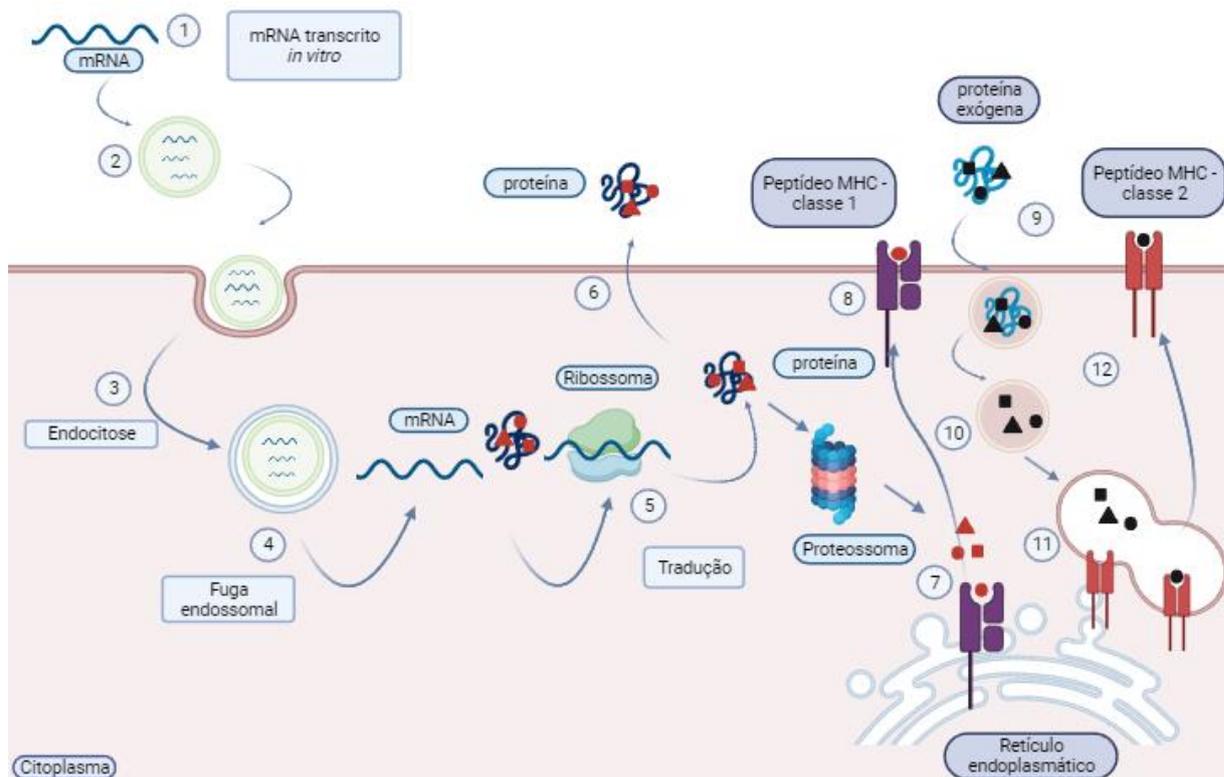


Figura II: Mecanismo de ação das vacinas mRNA nas células dendríticas

(1) mRNA transcrito *in vitro* (2) Captura do mRNA para entrada na célula dendrítica (CD) (3) Endocitose (4) Ocorre a fuga endossomal do mRNA e este é libertado para o citoplasma. (5) Ocorre tradução do mRNA em proteína (antígeno), pela ação do ribossoma. A proteína sofre modificações pós-tradução e pode ter ação na célula onde foi formada. (6) A proteína é secretada para o exterior da célula. (7) A proteína (antígeno) é degradada pelo proteossoma no citoplasma. O epítopo gerado é transportado até ao retículo endoplasmático e aí é apresentado ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I. (8) O complexo epítopo-MHC-classe I são apresentados à superfície da célula, levando à indução da resposta das células T CD8+, após estas o reconhecerem através dos seus recetores. (9) Proteínas exógenas entram nas CDs por *uptake* celular. (10) São degradadas pelos endossomas e apresentadas ao MHC-classe II. (11) É formado o complexo epítopo-MHC-classe II. (12) O complexo anteriormente formado é apresentado à superfície das células, levando à indução da resposta das células T CD4+. Proteínas exógenas também podem ser apresentadas ao MHC-classe I através de um mecanismo conhecido como “apresentação cruzada”.

(Adaptado de Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, *et al.* 2020)

Imagem criada com Biorender.com

4. Inteligência Artificial (IA)

A Inteligência Artificial (IA) abrange vertentes como o *machine learning* (ML) e o *deep learning* (DL)⁵³. *Machine learning* difere dos *softwares* tradicionais pela sua capacidade de originar um *output* (resultado) utilizando os dados disponibilizados; quanto maior for a quantidade e variedade dos dados a que o sistema ML tiver acesso, melhor será a resposta gerada. As funções de um sistema ML podem ser – descritivas, preditivas e prescritivas. Nas últimas duas décadas, os desenvolvimentos no campo do ML permitiram a criação de algoritmos

computacionais que são capazes de fazer previsões utilizando dados previamente adquiridos⁵⁴. Os sistemas *deep learning* tiram partido da *Artificial Neural Networking* (ANN) – técnica ML que promove a aprendizagem do sistema mimetizando a forma como os neurónios comunicam entre si, sendo construída com base no cérebro humano. A ANN consiste numa entrada (*input*), camada de saída e uma conexão oculta (entre a camada de entrada e saída), onde é realizado o processamento de dados⁵⁵ (Figura III). Assim, os sistemas DL são essencialmente uma ANN com três ou mais camadas capazes de desempenhar tarefas de forma autónoma.

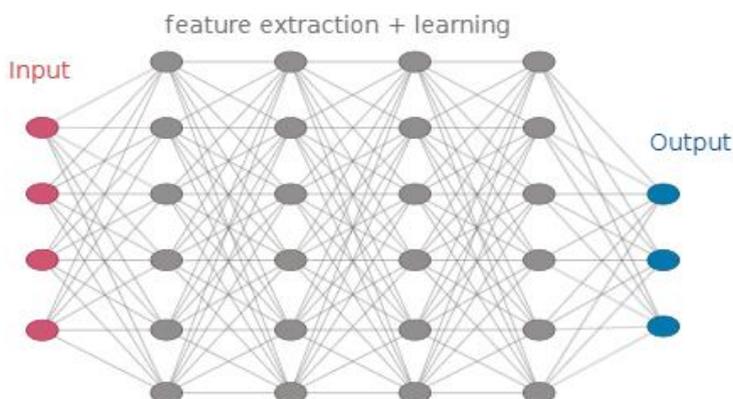


Figura III: Deep Learning – Neural Network.

Representação de um modelo *deep learning* com quatro camadas. Num primeiro passo os dados são fornecidos ao sistema (*input*), seguindo-se o processamento de informação pelas quatro camadas de ANN (conexão oculta - *feature extraction + learning*) e, por fim, é gerada uma resposta (*output*).

Imagem criada com Biorender.com

Em contraste com os sistemas ML, que requerem um *input* de dados pelo humano, os sistemas DL podem ser treinados para recolher, classificar e utilizar a informação adequada a cada caso^{55; 56}. O sucesso da utilização de modelos *deep learning* em tarefas relacionadas com biologia molecular, deve-se, em parte, à capacidade que estes sistemas apresentam de processar interações não lineares e complexas^{57; 58}.

4.1 Utilização de IA no desenvolvimento de novas moléculas personalizadas

As terapêuticas com mRNA são o resultado de décadas de pesquisa com vista o melhoramento de fatores como a estabilidade, controlo da resposta imune gerada e eficácia na entrega, culminando na expressão *in vivo* da proteína pretendida para o efeito terapêutico. Subjacente a estes eventos está o desenvolvimento de novos métodos e análogos 5' *cap*, utilização de nanopartículas lipídicas e bases quimicamente modificadas^{59; 60; 61}. A aplicação de

sistemas de IA no desenvolvimento de vacinas mRNA para a imunoterapia do cancro, tem vindo a ser alvo de estudos nos últimos anos, sendo uma área que despertou interesse na indústria farmacêutica. Deste modo, existem já alguns modelos que são capazes de ajudar no desenvolvimento de terapêuticas de mRNA, podendo estes atuar em diferentes fases da criação da molécula e personalização da mesma. Nesta fase, irei abordar modelos de inteligência artificial que foram aplicados em estudos de vacinas e imunoterapia do cancro.

4.1.1 *Optimus 5-Prime* – Eficácia de tradução de proteínas

A tradução da *open reading frame* (ORF) – zona onde se encontra codificada a proteína de interesse – é influenciada pela sequência de elementos da extremidade 5' UTR⁶². A tradução começa com a ligação dos ribossomas à extremidade 5' do mRNA e realiza um *scan* ao longo da região 5'UTR até encontrar um local de iniciação de tradução⁶³. Modelos ML podem ser utilizados para previsão da eficácia da tradução da sequência 5'UTR. Este tipo de modelos requer uma grande variedade de dados, para a resposta gerada ter a maior qualidade e eficácia possível. As sequências de transcrição endógenas não são as mais indicadas para o modelo ML preditivo alcançar o melhor desempenho, pois o tamanho limitado do transcriptoma humano, não permite que o modelo seja treinado de forma eficiente. Este necessita de uma grande quantidade de dados⁶⁴, para além que as sequências endógenas com efeitos patogénicos não são representadas de forma significativa, podendo gerar *blind spots* nos modelos. Uma alternativa ao transcriptoma humano é a utilização de *massively parallel reporter assays* (MPRAs), bibliotecas com grandes quantidades de sequências sintéticas, como fatores de transcrição e sequências codificadoras de proteínas; a variação é restrita e é capaz de fornecer mais dados ao modelo do que os exemplos retirados do genoma. Estas bibliotecas são utilizadas como *input*^{65; 66}.

O modelo DL, *Optimus 5-Prime*, prevê o número de ribossomas envolvidos na tradução do mRNA para proteínas – *mean ribosome loading* (MRL) – de uma determinada sequência 5'UTR, de um MPRA⁶⁷. O *Optimus 5-Prime* contém duas camadas de conexão oculta com filtros capazes de identificar pequenas sequências proteicas de um vetor UTR (*input*) e gerar uma previsão de MRL (*output*). Tendo em consideração que o MRL gerado é uma medida quantitativa da eficácia da tradução de proteínas de uma sequência 5'UTR, a aplicação destes modelos é vantajosa nas terapêuticas de mRNA⁵⁷.

4.1.2 Mapeamento com *Deep Learning* com material genético de cada indivíduo

As mutações específicas de tumores encontradas nos neoantígenos são os alvos ideais para o sistema imunitário distinguir as células tumorais das normais^{68; 69}. A ação natural dos linfócitos T em resposta aos neoantígenos detetada antes da vacinação, demonstra o potencial terapêutico da utilização de vacinas que iram reforçar essa ação e induzir novas células T direcionadas aos neoantígenos^{70; 71}. Para uma maior eficácia deste tipo de terapêutica, é essencial que esta seja o mais compatível com o doente quanto possível, a identificação dos neoantígenos para a terapêutica seguem duas fases: primeiramente, é realizada a sequenciação do exoma dos tecidos normais e tumorais, de modo a encontrar as mutações somáticas; de seguida, é feita a previsão de quais os peptídeos com mutações são mais prováveis de serem apresentados pelas proteínas do MHC às células T^{70; 71}.

Estudos realizados com um modelo DL, com vista a personalização das vacinas para o cancro, através da identificação dos neoantígenos HLA-I e HLA-II (*Human Leukocyte Antigens*) a partir de espectrometria de massa (*de novo sequencing* – processo que consiste na sequenciação de um genoma para o qual não há uma sequência genómica de referência⁷²), tiraram partido da informação de cada doente para treinar o modelo IA (*Deep Novo*) de forma personalizada, nomeadamente, um conjunto de peptídeos HLA normais que o sistema utilizou para gerar previsões de possíveis mutações dos peptídeos HLA daquele indivíduo⁷⁰. Os HLA são genes presentes no cromossoma 6 que ajudam à codificação de proteínas que são apresentadas à superfície das APCs e apresentam grande variabilidade entre indivíduos^{73; 74}.

Este método foi aplicado com cinco doentes com melanoma e foram identificados, em média e por doente, 154 HLA-I e 47 HLA-II neoantígenos, incluindo neoantígenos já com resposta imune conhecida e neoantígenos que ainda não havia registo em estudos anteriores. Estes peptídeos HLA apresentam as mesmas características imunológicas, essenciais para o sucesso da imunoterapia, que outros antígenos humanos relatados anteriormente, sendo essas: imunogenicidade, nível de expressão e afinidade de ligação. Deste modo, é possível concluir que os modelos personalizados apresentam uma taxa de eficácia superior aos modelos genéricos de 14,3%⁷⁰.

4.1.3 Barreiras extracelulares

As barreiras extracelulares e intracelulares, como foi anteriormente referido, apresentam um desafio no desenvolvimento de vacinas mRNA para a imunoterapia. Existem vários tipos de moléculas e outros fatores no meio extracelular que impedem o material administrado de

chegar aos tecidos alvo. Sendo que, alguns destes fatores podem levar à clearance e degradação dos nanovetores mais rapidamente, como por exemplo, o facto de células presentes na corrente sanguínea possuírem carga negativa e formarem ligações eletrostáticas com os veículos, induzindo a sua remoção da circulação⁷⁵. A compreensão do meio envolvente do alvo terapêutico é essencial para o sucesso, desta maneira, o uso de inteligência artificial nestes casos pode ser vantajoso, na medida em que reduz o tempo e custos e os resultados superam os obtidos com modelos convencionais.

A integração de machine learning e *surface-enhanced Raman spectroscopy* (SERS) – técnica de alta sensibilidade e seletividade que permite identificar a estrutura de metabolitos em baixas concentrações⁷⁶ – torna possível a obtenção de detalhes dos metabolitos do meio extracelular (estrutura, interação das moléculas como as nanopartículas utilizadas para encapsulação do mRNA)^{77; 78}. A conjugação de SERS com modelos DL permite obter informações dos nanovetores quando estes se encontram na corrente sanguínea e das interações moleculares ocorridas^{54; 79}.

Após a passagem pela corrente sanguínea, os nanovetores têm de atravessar a barreira endotelial até ao tecido-alvo. Consoante o órgão a barreira endotelial apresenta propriedades diferentes, sendo este um desafio no desenvolvimento de vacinas. Assim, a aplicação de modelos DL autónomos com capacidade de fornecer imagens de células vivas e interpretá-las, permitindo a determinação da permeabilidade celular das várias barreiras endoteliais, deste modo, é possível determinar o tamanho dos nanovetores de entrega a utilizar^{54; 80}. Modelos DL equipados com microscópios de fluorescência podem também obter imagens que permitem classificação celular, através do citoesqueleto, e imagens do meio intracelular (organelos) com elevada precisão^{54; 81; 82}.

4.1.4 Previsão toxicidade dos materiais usados - veículo de entrega

Os princípios para o desenvolvimento de nanoterapias para tumores sólidos são: permeabilidade, efeito de retenção e os efeitos de circulação prolongada. Deste modo, o estudo de vacinas deve ter em consideração a farmacocinética, a farmacodinâmica, assim como a possível toxicidade, que pode resultar da interação das nanopartículas com os componentes biológicos devido às diferentes propriedades físico-químicas entre estes elementos^{83; 84}. Modelos IA foram criados com o propósito de prever a toxicidade dos nanomateriais utilizados, nomeadamente, o modelo de GA-SVMC, que a partir dos dados genéticos e das propriedades dos materiais, tais como, tamanho, área de superfície, carga, estrutura química e reatividade é capaz de prever a toxicidade destes⁸⁵. Contudo, como a toxicidade pode ter

causas variáveis devidos às diferentes interações entre o meio biológico e os nanomateriais utilizados na vacinação, não existem ainda bases de dados robustas para permitir o desempenho máximo dos modelos IA.

Os polímeros como veículo de entrega apresentam eficácia, mas podem causar toxicidade, sendo esta propriedade um desafio em estudo. Os polímeros *poly(β-amino esters)* (PAEs) foram alvo de estudo pelas suas características que o tornam um candidato a vetor para terapia génica⁸⁶. Foi avaliado o *ratio* entre a combinação ideal dos diferentes componentes do polímero – *polymer component distribution* (PCD) – e a eficácia de entrega do material genético. Para este efeito foi utilizado um modelo ML-DL que tirou partido de dados, previamente preparados. Para cada componente do polímero foi demonstrada a sua eficácia da entrega individualmente, a partir destes dados, foi gerada uma base de dados com diferentes PAEs cada um com o seu PCD, por fim, o modelo IA foi estabelecida uma relação PCD-eficácia de entrega para o polímero, dando uma previsão de um PAE com um PCD otimizado⁸⁷.

4.2 Modelos IA para o *design* de vacinas mRNA

O interesse despertado pelas vacinas mRNA e da aplicação destas na terapia do cancro, levou o mercado farmacêutico a procurar soluções que agilisassem processos para acelerar os estudos e desenvolvimentos das mesmas de forma segura e eficaz. Empresas pioneiras no desenvolvimento das vacinas para o SARS-CoV-2 utilizando modelos IA, como foi o caso da empresa Baidu Inc[®] Research, estão agora a aplicar modelos semelhantes para vacinas a serem utilizadas na imunoterapia do cancro. Entretanto, outras empresas também já anunciaram que modelos IA estão a ser aplicados neste campo (Tabela I).

Tabela I: Empresas farmacêuticas que apostaram na tecnologia IA para o desenvolvimento de vacinas mRNA para o tratamento do cancro.

Instituição	Algoritmo IA utilizado	Patologia (Indicação terapêutica)	Referências Bibliográficas
Moderna, Inc [®] e IBM [®]	<i>MolFormer</i>	Nanopartículas lipídicas (NPLs) para entrega de vacinas mRNA	⁸⁸
Baidu Inc [®] Research	<i>LinearDesign</i>	Vacinas mRNA personalizadas para o cancro	⁸⁹
OncXerna Therapeutics [®]	<i>Xerna[™] TME Panel</i>	Personalização da terapêutica (cancro do ovário, mama e colorretal)	⁹⁰

A empresa Moderna, Inc[®] tem neste momento duas vacinas em fase I de ensaios clínicos para a imunoterapia do cancro, mRNA-2752 e MEDII 191. A primeira, utiliza nanopartículas lipídicas para a entrega e utiliza o mRNA como agente terapêutico (mRNA-2752), sendo o mecanismo de ação a indução das citocinas pró-inflamatórias IL-23, IL36 γ . Revelou tolerância e segurança quando combinada com durvalumab (inibidor PD-L1) e efeito sinérgico. Tem indicação terapêutica para tumores sólidos/linfoma⁹¹. Relativamente à segunda terapia, MEDII 19, com indicação para tumores sólidos, demonstrou atividade, em certos doentes na combinação MEDII 19 + durvalumab. É uma terapia mRNA que promove a produção local da interleucina IL-12 nos tumores. Após a fase I dos ensaios clínicos, não foram detetadas doses tóxicas^{92, 93}.

A aposta nesta área incorporou a inteligência artificial, tendo um acordo entre as empresas Moderna, Inc[®] e IBM[®] (empresa de *software* IA) sido anunciado em abril de 2023⁸⁸. O modelo a ser treinado para a terapia mRNA é o *MolFormer*. *Software* já existente que tem uma base de dados robusta que inclui linguagem química, que permite capturar as propriedades e estruturas moleculares⁹⁴. O objetivo será otimizar as nanopartículas lipídicas, de modo, a evitar a degradação do mRNA.

As vacinas mRNA têm a limitação da instabilidade e degradação, que leva à diminuição da eficácia na tradução em proteínas, representando, assim, um desafio para o armazenamento e distribuição das mesmas⁹⁵. A estabilidade das moléculas de mRNA está correlacionada com a estrutura secundária, devido à estabilidade termodinâmica da mesma. Deste modo, o algoritmo utilizado deve ser capaz de melhorar a estabilidade e a região do codão (otimização), de modo a aumentar a expressão de proteínas. O modelo utilizado pela empresa Baidu Inc[®], o *LinearDesign*, é capaz de realizar esta tarefa⁸⁹. É formulado um *design space* para o mRNA, utilizando um método que realiza uma transição de informação para cada símbolo ou estado que encontra – *deterministic finite-state automaton* (DFA) –, sendo capaz de codificar exponencialmente moléculas mRNA, posteriormente, o modelo encontra a molécula mRNA mais estável ou o balanço ideal entre estabilidade e o codão otimizado.

O modelo *Xerna™ TME Panel* tira partido de componentes biológicos do microambiente inerente ao tumor, que são relevantes para os doentes. O algoritmo consiste numa ANN treinada como 124 genes (*input*), sendo otimizado para vários tumores sólidos. A informação de expressão genética e os dados clínicos de 2723 doentes, com diferentes tipos de tumor como base de dados - gástrico, ovário, colorretal, melanoma, e uma combinação dos três anteriores-, foram utilizados para treinar o algoritmo. O modelo tornou-se capaz de distinguir

quatro subtipos de microambientes tumorais (*output*): angiogénese (A), imunidade ativa (IA), imunidade deserta (ID) e imunidade suprimida (IS)⁹⁰. O resultado gerado permite selecionar o tratamento que mais se adequa a cada doente (Figura IV).

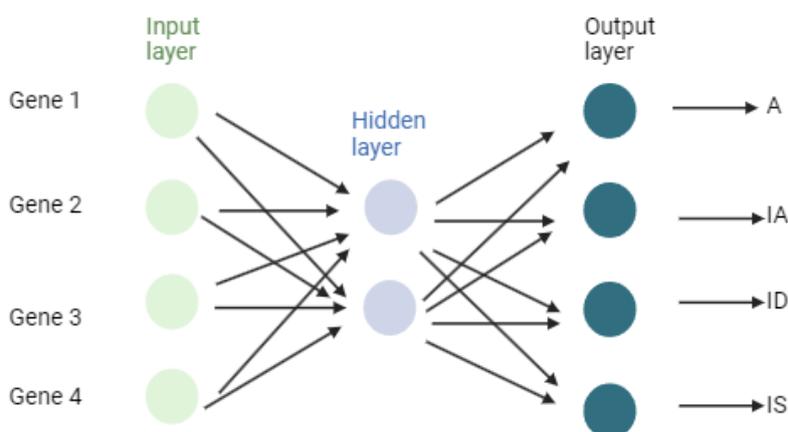


Figura IV: Modelo ANN.

O resultado do *output* irá determinar o tipo de terapêutica utilizada. Se for angiogénese (A), irão ser utilizados agentes anti-angiogénese. Imunidade ativa (IA) serão utilizados inibidores do *immune checkpoint*. Imunidade suprimida (IS) requiere uma combinação de imunoterapias, como anticorpos monoclonais. Por fim, no caso de imunidade deserta (ID) serão utilizadas vacinas tumorais. (Adaptado de UHLIK, Mark *et al.*, 2023)

Imagem criada com Biorender.com

Este modelo gerou a utilização em ensaios clínicos de duas moléculas para a imunoterapia do cancro. Sendo a primeira, navicixizumab um anticorpo biespecífico – *delta-like ligand 4* (DLL4)/*vascular endotelial growth factor* (VEGF) – que tem como alvo a angiogénese, inibindo os dois fatores DLL4/VEGF. Na fase Ia e Ib dos ensaios realizados navicixizumab demonstrou atividade antitumoral no cancro do ovário. A segunda molécula, bavituximab tem como alvo a fosfatidilserina e permite respostas dos inibidores de *checkpoint* em doentes com tumores sólidos (cancro do ovário, da mama e colorretal).

4.3 Vacina personalizada com neoantigénio TG4050

A fase I dos ensaios clínicos da vacina personalizada para a imunoterapia do cancro utilizando os *softwares* das empresas Transgene® (*myvac*® – tecnologia baseada em vetores virais para a imunoterapia individualizada em tumores sólidos) e NEC Corporation® demonstrou que a vacina TG4050 é segura e tem a capacidade de induzir uma resposta mediada pelas células T, independente do haplótipo HLA. A vacina é preparada para cada doente oncológico.

O *myvac*® tem como objetivo gerar vários neoantigénios, de acordo com as mutações de cada doente e, posteriormente, os neoantigénios utilizados na terapia são selecionados pelo modelo IA NEC's *Neoantigen Prediction System*, de modo a estimular a resposta imune, para

que os tumores sejam reconhecidos e destruídos. Estes modelos foram treinados para selecionar as sequências com maior potencial imunogénico.

A fase I foi realizada com dois grupos, o primeiro era composto por doentes oncológicos com cancro do ovário (*High-Grade Serous Carcinoma*) e o segundo grupo por doentes com cancro na cabeça e pescoço. O primeiro grupo foi tratado apenas com vacina, na recaída assintomática com base em dados radiológicos ou elevação do antigénio CA-125. Ao segundo grupo, foi administrada a vacina após cirurgia durante a remissão ou durante o tratamento padrão. A administração foi realizada semanalmente durante seis semanas e a dose reforço a cada três semanas durante um ano ou até serem detetados progressos. A fase II dos ensaios clínicos começará ainda este ano^{96, 97}.

5. Conclusões e Perspetivas futuras

A terapêutica mRNA é uma área em expansão que nos últimos anos tem vindo a ser aplicada em ensaios clínicos e estudos para imunoterapia do cancro. As vantagens que apresenta relativamente a outras terapias génicas, levaram a que esforços, para desenvolver vacinas imuno-oncológicas, tenham sido feitos de modo a superar os diversos desafios de eficácia, segurança e estabilidade que estas formulações apresentam. As moléculas RNA, especialmente, mRNA, permitem a personalização da terapêutica devido às suas características estruturais e funcionais. A pesquisa sobre as interações moleculares e reações imunológicas despertadas por tumores, permitiu a melhor compreensão destes mecanismos e, deste modo, também melhor perceção das terapêuticas a aplicar para melhor modulação. Os avanços obtidos nos estudos com mRNA, permitiram também perceber como este é capaz de despertar a resposta imune *in vivo* e como o veículo de entrega utilizado pode afetar a eficácia da terapêutica.

A necessidade de automação de processos e de respostas para os desafios encontrados, levou a indústria farmacêutica a apostar em algoritmos de inteligência artificial para desempenharem funções em diferentes fases de desenvolvimento das vacinas para a imunoterapia do cancro. Modelos *Machine Learning* e *Deep Learning* foram usados em diversos estudos. A utilização destes modelos, permite a redução de custos e menor margem para erro, comparando com outros modelos tentativa-erro aplicados. O facto de poderem ser desenvolvidos algoritmos para atuarem em vários campos da imunoterapia, apresenta uma mais-valia para o futuro. Contudo, estes modelos requerem bases de dados robustas para terem o desempenho ideal, sendo esta ainda uma limitação desta tecnologia.

As empresas anteriormente referidas – Moderna, Inc[®], Baidu Inc[®] Research, OncXerna Therapeutics[®] - demonstraram interesse por esta vertente, anunciando que iriam aplicar algoritmos IA no desenvolvimento de terapias mRNA. A alemã BioNTech[®] também revelou o interesse em utilizar esta tecnologia para investigação, desenvolvimento e *design*, ao anunciar que irá adquirir a empresa de *software* IA InstaDeep[®], também tendo em vista o uso de ML para a personalização de vacinas mRNA. Previamente, as duas empresas já haviam colaborado no desenvolvimento de vacinas RNA personalizadas para o tratamento do melanoma, utilizando um modelo ML para gerar uma previsão dos neoantígenos a utilizar nas vacinas, após a identificação individual das mutações, sendo assim possível o fabrico de uma vacina única para cada paciente, tendo todos os indivíduos apresentado elevada taxa de resposta pelas células T, havendo redução das metástases após o início da administração das vacinas⁹⁸.

A aposta na área terapêutica envolvendo mRNA e algoritmos de inteligência artificial é notória. Deste modo, os primeiros passos estão a ser dados para a continuação da evolução da imunoterapia na área da oncologia e também para a apresentação de soluções para problemas de outras áreas da ciência. Destacando a importância da cooperação de diferentes áreas profissionais para a concretização destes trabalhos, através dos conhecimentos cedidos por cada parte.

6. Bibliografia

1. **Cancer** – (Consultado a 11 de agosto de 2023). Disponível na internet: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
2. HEINE, Annkristin; JURANEK, Stefan; BROSSART, Peter - Clinical and immunological effects of mRNA vaccines in malignant diseases. **Molecular Cancer**. ISSN 14764598. 20:1 (2021). doi: 10.1186/s12943-021-01339-1.
3. DISIS, Mary L. - Mechanism of Action of Immunotherapy. [s.d.]. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.09.004.
4. SHIRAVAND, Yavar *et al.* - Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. **Current Oncology**. ISSN 17187729. 29:5 (2022) 3044. doi: 10.3390/CURRONCOL29050247.
5. KIM, Young Kook - RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects. **Experimental & Molecular Medicine** 2022 54:4. ISSN 2092-6413. 54:4 (2022) 455–465. doi: 10.1038/s12276-022-00757-5.
6. DOLGIN, Elie - The tangled history of mRNA vaccines. **Nature**. ISSN 14764687. 597:7876 (2021) 318–324. doi: 10.1038/D41586-021-02483-W.
7. WEI, Huan Huan; ZHENG, Liangliang; WANG, Zefeng - mRNA therapeutics: New vaccination and beyond. **Fundamental Research**. ISSN 2667-3258. 2023). doi: 10.1016/j.FMRE.2023.02.022.
8. TENCHOV, Rumiana *et al.* - Lipid Nanoparticles from Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. **ACS Nano**. ISSN 1936086X. 15:11 (2021) 16982–17015. doi: 10.1021/acsnano.1c04996.
9. GOTTE, Giovanni; MENEGAZZI, Marta - Biological Activities of Secretory RNases: Focus on Their Oligomerization to Design Antitumor Drugs. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 10:2019) 2626. doi: 10.3389/FIMMU.2019.02626.
10. TENCHOV, Rumiana *et al.* - Lipid Nanoparticles from Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. **ACS Nano**. ISSN 1936086X. 15:11 (2021) 16982–17015. doi: 10.1021/ACSNANO.1C04996/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NNIC04996_0026.GIF.
11. DUAN, Li-Juan *et al.* - Potentialities and Challenges of mRNA Vaccine in Cancer Immunotherapy. [s.d.]. doi: 10.3389/fimmu.2022.923647.

12. XU, Zhijie *et al.* - Applying artificial intelligence for cancer immunotherapy. [s.d.]. doi: 10.1016/j.apsb.2021.02.007.
13. HE, Qing *et al.* - mRNA cancer vaccines: Advances, trends and challenges. [s.d.]. doi: 10.1016/j.apsb.2022.03.011.
14. HOLLINGSWORTH, Robert E.; JANSEN, Kathrin - Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. [s.d.]. doi: 10.1038/s41541-019-0103-y.
15. ZHANG, Zheyang *et al.* - Neoantigen: A New Breakthrough in Tumor Immunotherapy. [s.d.]. doi: 10.3389/fimmu.2021.672356.
16. ROONEY, Michael S. *et al.* - Article Molecular and Genetic Properties of Tumors Associated with Local Immune Cytolytic Activity. [s.d.]. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.033.
17. WANG, David; FARHANA, Aisha - Biochemistry, RNA Structure. **StatPearls**. 2023).
18. JURADO, Ashley R. *et al.* - Structure and Function of Pre-mRNA 5'-End Capping Quality Control and 3'-End Processing. 2014). doi: 10.1021/bi401715v.
19. RAMANATHAN, Anand; ROBB, G. Brett; CHAN, Siu Hong - mRNA capping: biological functions and applications. **Nucleic Acids Research**. ISSN 13624962. 44:16 (2016) 7511. doi: 10.1093/NAR/GKW551.
20. DENG, Zhuoya *et al.* - mRNA Vaccines: The Dawn of a New Era of Cancer Immunotherapy. [s.d.]. doi: 10.3389/fimmu.2022.887125.
21. WADHWA, Abishek *et al.* - Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines. **Pharmaceutics**. ISSN 19994923. 12:2 (2020). doi: 10.3390/PHARMACEUTICS12020102.
22. AVCI-ADALI, Meltem *et al.* - In Vitro Synthesis of Modified mRNA for Induction of Protein Expression in Human Cells. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**. ISSN 1940087X. 93 (2014) 51943. doi: 10.3791/51943.
23. NITIKA; WEI, Jiao; HUI, Ai Min - The Delivery of mRNA Vaccines for Therapeutics. **Life**. ISSN 20751729. 12:8 (2022). doi: 10.3390/life12081254.
24. DELEHEDDE, Christophe *et al.* - Intracellular Routing and Recognition of Lipid-Based mRNA Nanoparticles. **Pharmaceutics**. ISSN 19994923. 13:7 (2021). doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13070945.

25. SMITH, Samuel A. *et al.* - The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. **Bioconjugate Chemistry**. ISSN 15204812. 30:2 (2019) 263–272. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00732.
26. SCHLEE, Martin; HARTMANN, Gunther - Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. **Nature Reviews Immunology** 2016 16:9. ISSN 1474-1741. 16:9 (2016) 566–580. doi: 10.1038/nri.2016.78.
27. RITTIG, Susanne M. *et al.* - Intradermal Vaccinations With RNA Coding for TAA Generate CD8+ and CD4+ Immune Responses and Induce Clinical Benefit in Vaccinated Patients. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 19:5 (2011) 990. doi: 10.1038/MT.2010.289.
28. BALHORN, Rod - The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biology**. ISSN 14747596. 8:9 (2007) 227. doi: 10.1186/GB-2007-8-9-227.
29. SCHEEL, Birgit *et al.* - Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA. **European Journal of Immunology**. ISSN 00142980. 36:10 (2006) 2807–2816. doi: 10.1002/EJL.200635910.
30. KOWALSKI, Piotr S. *et al.* - Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 27:4 (2019) 710. doi: 10.1016/j.ymt.2019.02.012.
31. YANG, Wenqian *et al.* - Polymer-Based mRNA Delivery Strategies for Advanced Therapies. **Advanced Healthcare Materials**. ISSN 21922659. 12:15 (2023). doi: 10.1002/ADHM.202202688.
32. GODA, Tatsuro - Chemically Induced pH Perturbations for Analyzing Biological Barriers Using Ion-Sensitive Field-Effect Transistors. **Sensors (Basel, Switzerland)**. ISSN 14248220. 21:21 (2021). doi: 10.3390/S21217277.
33. XUE, Hui Yi; LIU, Shimeng; WONG, Ho Lun - Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. **Nanomedicine (London, England)**. ISSN 17486963. 9:2 (2014) 295. doi: 10.2217/NNM.13.204.
34. HUANG, Tao *et al.* - Lipid nanoparticle-based mRNA vaccines in cancers: Current advances and future prospects. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 13:2022) 922301. doi: 10.3389/FIMMU.2022.922301/BIBTEX.
35. EYGERIS, Yulia *et al.* - Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery. **Nano Letters**. ISSN 15306992. 20:6 (2020) 4543–4549. doi: 10.1021/ACS.NANOLETT.0C01386/ASSET/IMAGES/LARGE/NL0C01386_0005.JPEG.

36. BILLINGSLEY, Margaret M. *et al.* - Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated mRNA Delivery for Human CAR T Cell Engineering. **Nano letters**. ISSN 15306992. 20:3 (2020) 1578. doi: 10.1021/ACS.NANOLETT.9B04246.
37. CULLIS, Pieter R.; HOPE, Michael J. - Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 25:7 (2017) 1467. doi: 10.1016/j.YMTHE.2017.03.013.
38. PARDI, Norbert *et al.* - Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**. ISSN 18734995. 217:2015) 345. doi: 10.1016/j.JCONREL.2015.08.007.
39. ZENG, Chunxi *et al.* - Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines. **Current topics in microbiology and immunology**. ISSN 21969965. 440:2022) 71. doi: 10.1007/82_2020_217.
40. PASTON, Samantha J. *et al.* - Cancer Vaccines, Adjuvants, and Delivery Systems. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 12:2021). doi: 10.3389/fimmu.2021.627932.
41. MIAO, Lei; ZHANG, Yu; HUANG, Leaf - mRNA vaccine for cancer immunotherapy. **Molecular Cancer**. ISSN 14764598. 20:1 (2021). doi: 10.1186/s12943-021-01335-5.
42. LIU, Haipeng *et al.* - Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines. **Nature** 2014 507:7493. ISSN 1476-4687. 507:7493 (2014) 519–522. doi: 10.1038/nature12978.
43. LIU, Jian *et al.* - Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. **Journal of Hematology & Oncology** 2022 15:1. ISSN 1756-8722. 15:1 (2022) 1–26. doi: 10.1186/S13045-022-01247-X.
44. VISHWESHWARAIAH, Yashavantha L.; DOKHOLYAN, Nikolay V. - mRNA vaccines for cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 13:2022). doi: 10.3389/FIMMU.2022.1029069.
45. RAMACHANDRAN, Sivakumar *et al.* - Delivery Strategies for mRNA Vaccines. **Pharmaceutical Medicine**. 36:123AD) 11–20. doi: 10.1007/s40290-021-00417-5.
46. WARREN, Luigi *et al.* - Cell Stem Cell Article Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. [s.d.]. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.012.

47. GU, Yang Zhuo; ZHAO, Xing; SONG, Xiang Rong - Ex vivo pulsed dendritic cell vaccination against cancer. **Acta Pharmacologica Sinica**. ISSN 17457254. 41:7 (2020) 959. doi: 10.1038/S41401-020-0415-5.
48. ZHANG, Jun Ming; AN, Jianxiong - Cytokines, Inflammation and Pain. **International anesthesiology clinics**. ISSN 00205907. 45:2 (2007) 27. doi: 10.1097/AIA.0B013E318034194E.
49. SCHEEL, Birgit *et al.* - Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. **European Journal of Immunology**. ISSN 00142980. 35:5 (2005) 1557–1566. doi: 10.1002/EJL.200425656.
50. SITTPLANGKON, Chutamath *et al.* - mRNA vaccine with unmodified uridine induces robust type I interferon-dependent anti-tumor immunity in a melanoma model. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 13:2022). doi: 10.3389/fimmu.2022.983000.
51. SANTOS, Patricia M.; BUTTERFIELD, Lisa H. - Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**. ISSN 25337602. 200:2 (2018) 443. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1701024.
52. HEATH, William R. *et al.* - Antigen presentation by dendritic cells for B cell activation. **Current Opinion in Immunology**. ISSN 0952-7915. 58:2019) 44–52. doi: 10.1016/j.COI.2019.04.003.
53. GUI, Y. ;. *et al.* - Artificial Intelligence-Assisted Transcriptomic Analysis to Advance Cancer Immunotherapy. **Journal of Clinical Medicine 2023, Vol. 12, Page 1279**. ISSN 2077-0383. 12:4 (2023) 1279. doi: 10.3390/JCM12041279.
54. HASANZADEH, Akbar *et al.* - Could artificial intelligence revolutionize the development of nanovectors for gene therapy and mRNA vaccines? **Nano Today**. 47:2022) 101665. doi: 10.1016/j.nantod.2022.101665.
55. YANG, Young Joo; BANG, Chang Seok - Application of artificial intelligence in gastroenterology. **World Journal of Gastroenterology**. ISSN 22192840. 25:14 (2019) 1666. doi: 10.3748/WJG.V25.I14.1666.
56. KAUL, Vivek; ENSLIN, Sarah; GROSS, Seth A. - History of artificial intelligence in medicine. **Gastrointestinal Endoscopy**. ISSN 10976779. 92:4 (2020) 807–812. doi: 10.1016/j.gie.2020.06.040.

57. CASTILLO-HAIR, Sebastian M.; SEELIG, Georg - Machine Learning for Designing Next-Generation mRNA Therapeutics. **Accounts of Chemical Research**. ISSN 15204898. 55:1 (2022) 24–34. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00621.
58. BOGARD, Nicholas *et al.* - A Deep Neural Network for Predicting and Engineering Alternative Polyadenylation. **Cell**. ISSN 10974172. 178:1 (2019) 91-106.e23. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.046.
59. HENDERSON, Jordana M. *et al.* - Cap 1 Messenger RNA Synthesis with Co-transcriptional CleanCap[®] Analog by In Vitro Transcription. **Current Protocols**. ISSN 2691-1299. 1:2 (2021) e39. doi: 10.1002/CPZ1.39.
60. HOU, Xucheng *et al.* - Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials** 2021 6:12. ISSN 2058-8437. 6:12 (2021) 1078–1094. doi: 10.1038/s41578-021-00358-0.
61. ANDRIES, Oliwia *et al.* - 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**. ISSN 0168-3659. 217:2015) 337–344. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.051.
62. HINNEBUSCH, Alan G.; IVANOV, Ivaylo P.; SONENBERG, Nahum - Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. **Science (New York, N.Y.)**. ISSN 1095-9203. 352:6292 (2016) 1413–1416. doi: 10.1126/SCIENCE.AAD9868.
63. HINNEBUSCH, Alan G. - The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. 2014). doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035802.
64. SUN, Chen *et al.* - Revisiting Unreasonable Effectiveness of Data in Deep Learning Era. [s.d.].
65. GALLEGO ROMERO, Irene; LEA, Amanda J. - Leveraging massively parallel reporter assays for evolutionary questions. **Genome Biology** 2023 24:1. ISSN 1474-760X. 24:1 (2023) 1–18. doi: 10.1186/S13059-023-02856-6.
66. KINNEY, Justin B.; MCCANDLISH, David M. - Massively Parallel Assays and Quantitative Sequence–Function Relationships. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118-014845>. ISSN 1545293X. 20:2019) 99–127. doi: 10.1146/ANNUREV-GENOM-083118-014845.

67. KAROLLUS, Alexander; AVSEC, Žiga; GAGNEUR, Julien - Predicting mean ribosome load for 5'UTR of any length using deep learning. **PLoS Computational Biology**. ISSN 15537358. 17:5 (2021). doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1008982.
68. HILF, Norbert *et al.* - Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. **Marij J. P. Welters**. 11:[s.d.] 5. doi: 10.1038/s41586-018-0810-y.
69. HU, Zhuting; OTT, Patrick A.; WU, Catherine J. - Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. **Nature reviews. Immunology**. ISSN 14741741. 18:3 (2018) 168. doi: 10.1038/NRI.2017.131.
70. TRAN, Ngoc Hieu *et al.* - Personalized deep learning of individual immunopeptidomes to identify neoantigens for cancer vaccines 2. [s.d.]. doi: 10.1101/620468.
71. MÖSCH, Anja *et al.* - Machine Learning for Cancer Immunotherapies Based on Epitope Recognition by T Cell Receptors. **Frontiers in Genetics**. ISSN 16648021. 10:2019). doi: 10.3389/fgene.2019.01141.
72. HUGHES, Christopher; MA, Bin; LAJOIE, Gilles A. - De novo sequencing methods in proteomics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. ISSN 19406029. 604:2010) 105–121. doi: 10.1007/978-1-60761-444-9_8/COVER.
73. CRUX, Nicole B.; ELAHI, Shokrollah - Human Leukocyte Antigen (HLA) and immune regulation: How do classical and non-classical HLA alleles modulate immune response to human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections? **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 8:JUL (2017) 281746. doi: 10.3389/FIMMU.2017.00832/BIBTEX.
74. SELIGER, Barbara *et al.* - HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. **CANCER BIOLOGY**. 12:2002) 3–13. doi: 10.1006/scbi.2001.0404.
75. SAKURAI, F. *et al.* - Interaction between DNA–cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. **Gene Therapy** 2001 8:9. ISSN 1476-5462. 8:9 (2001) 677–686. doi: 10.1038/sj.gt.3301460.
76. HAN, Xiao Xia *et al.* - Surface-enhanced Raman spectroscopy. **Nature Reviews Methods Primers** 2022 1:1. ISSN 2662-8449. 1:1 (2022) 1–17. doi: 10.1038/s43586-021-00083-6.
77. LUSSIER, Félix *et al.* - Machine-Learning-Driven Surface-Enhanced Raman Scattering Optophysiology Reveals Multiplexed Metabolite Gradients Near Cells. **ACS Nano**. ISSN 1936086X. 2019). doi: 10.1021/ACSNANO.8B07024/SUPPL_FILE/NN8B07024_SI_001.PDF.

78. WALLACE, Gregory Q.; MASSON, Jean François - From single cells to complex tissues in applications of surface-enhanced Raman scattering. **Analyst**. ISSN 13645528. 145:22 (2020) 7162–7185. doi: 10.1039/d0an01274b.
79. SHIN, Hyunku *et al.* - Early-Stage Lung Cancer Diagnosis by Deep Learning-Based Spectroscopic Analysis of Circulating Exosomes. **ACS Nano**. ISSN 1936086X. 14:5 (2020) 5435–5444. doi: 10.1021/ACSNANO.9B09119/SUPPL_FILE/NN9B09119_SI_001.PDF.
80. OLIVER, C. Ryan *et al.* - A platform for artificial intelligence based identification of the extravasation potential of cancer cells into the brain metastatic niche. **Lab on a Chip**. ISSN 14730189. 19:7 (2019) 1162–1173. doi: 10.1039/C8LC01387J.
81. WIHAL, Ronald *et al.* - Convolutional neural network for cell classification using microscope images of intracellular actin networks. (2019). doi: 10.1371/journal.pone.0213626.
82. HAYASHI, Shinichi; OKADA, Yasushi - Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics. **Molecular Biology of the Cell**. ISSN 19394586. 26:9 (2015) 1743–1751. doi: 10.1091/MBC.E14-08-1287.
83. SINGH, Ajay Vikram *et al.* - Artificial Intelligence and Machine Learning in Computational Nanotoxicology: Unlocking and Empowering Nanomedicine. **Advanced Healthcare Materials**. ISSN 2192-2659. 9:17 (2020) 1901862. doi: 10.1002/ADHM.201901862.
84. SINGH, Ajay Vikram *et al.* - Artificial Intelligence and Machine Learning Empower Advanced Biomedical Material Design to Toxicity Prediction. **Advanced Intelligent Systems**. ISSN 2640-4567. 2:12 (2020) 2000084. doi: 10.1002/AISY.202000084.
85. TAN, Ping *et al.* - Artificial intelligence aids in development of nanomedicines for cancer management. **Seminars in Cancer Biology**. ISSN 1044-579X. 89:2023) 61–75. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2023.01.005.
86. LYNN, D. M.; LANGER, R. - Degradable Poly(β -amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. **Journal of the American Chemical Society**. ISSN 00027863. 122:44 (2000) 10761–10768. doi: 10.1021/JA0015388.
87. LI, Yinghao *et al.* - Artificial Intelligence (AI)-Aided Structure Optimization for Enhanced Gene Delivery: The Effect of the Polymer Component Distribution (PCD). **ACS applied materials & interfaces**. ISSN 19448252. 15:30 (2023) 36667–36675. doi: 10.1021/ACSAMI.3C05010/SUPPL_FILE/AM3C05010_SI_001.PDF.

88. **Moderna and IBM to Explore Quantum Computing and Generative AI for mRNA Science** – (Consultado a 30 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2023/Moderna-and-IBM-to-Explore-Quantum-Computing-and-Generative-AI-for-mRNA-Science/default.aspx>
89. ZHANG, He *et al.* - Algorithm for Optimized mRNA Design Improves Stability and Immunogenicity. **Nature**. ISSN 0028-0836. 2023). doi: 10.1038/s41586-023-06127-z.
90. UHLIK, Mark *et al.* - Xerna™ TME Panel is a machine learning-based transcriptomic biomarker designed to predict therapeutic response in multiple cancers. 2023). doi: 10.3389/fonc.2023.1158345.
91. PATEL, Manish *et al.* - 539 Phase I study of mRNA-2752, a lipid nanoparticle encapsulating mRNAs encoding human OX40L/IL-23/IL-36γ, for intratumoral (ITu) injection +/- durvalumab in advanced solid tumors and lymphoma. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**. ISSN 2051-1426. 9:Suppl 2 (2021) A569–A569. doi: 10.1136/JITC-2021-SITC2021.539.
92. **MEDI1191 Plus Durvalumab Appears Safe, Active in Advanced Solid Tumors - Cancer Therapy Advisor** – (Consultado a 23 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://www.cancertherapyadvisor.com/home/news/conference-coverage/american-association-for-cancer-research-aacr/aacr-2023/medi1191-durvalumab-advanced-solid-tumors-active-safe/>
93. **A Study of MEDI1191 in Sequential and Concurrent Combination With Durvalumab in Subjects With Advanced Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov** – (Consultado a 23 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03946800>
94. ROSS, Jerret *et al.* - Molformer: Large Scale Chemical Language Representations Capture Molecular Structure and Properties. 2022). doi: 10.21203/rs.3.rs-1570270/v1.
95. CROMMELIN, Daan J. A. *et al.* - Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. ISSN 15206017. 110:3 (2021) 997–1001. doi: 10.1016/j.xphs.2020.12.006.
96. DELORD, Jean-Pierre *et al.* - **Poster Session Phase I studies of personalized neoantigen vaccine TG4050 in ovarian carcinoma (OC) and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)**

97. **Study Record | ClinicalTrials.gov** – (Consultado a 23 de agosto de 2023). Disponível na internet: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03839524?tab=table>
98. SAHIN, Ugur *et al.* - Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. **Nature**. ISSN 14764687. 547:7662 (2017) 222–226. doi: 10.1038/nature23003.