



João Miguel Nogueira Rego

Vacinas de mRNA: o que são e perspectivas de utilização contra o cancro

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Olga Borges e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Vacinas de mRNA: o que são e perspetivas de utilização contra o cancro

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado
em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Olga Borges e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

João Miguel Nogueira Rego

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Índice

Resumo.....	2
<i>Abstract</i>	3
1. Introdução.....	4
1.1. mRNA: interesse acadêmico e empresarial.....	5
1.2. Regulamentação.....	6
2. Vacinas de mRNA.....	7
2.1. Tipos de RNA.....	9
2.2. Administração do RNA: formulações injetáveis.....	10
2.2.1. DCs.....	10
2.2.2. RNA puro.....	12
2.2.3. RNA associado a protamina.....	12
2.2.4. Abordagem <i>gen-gun</i>	12
2.2.5. Encapsulação em lipossomas.....	12
2.2.6. Vacinas de mRNA de dois componentes.....	13
2.3. Comparação dos dois métodos de vacinação mais comuns usando mRNA.....	14
3. Como aumentar a eficácia terapêutica.....	15
4. Estabilidade das formulações de mRNA.....	17
5. Internalização de mRNA nas células.....	18
6. Ensaios clínicos.....	18
7. Conclusão.....	20
8. Bibliografia.....	22

Resumo

Atualmente, o cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial provocando a morte a vários milhões de pessoas todos os anos. Tal facto revela a urgência em encontrar curas efetivas contra o cancro, tendo-se atualmente concentrado atenções no desenvolvimento de novas imunoterapias que combatam a doença, na qual se inclui as vacinas de mRNA.

Assim sendo, a presente monografia procura mostrar o que tem sido realizado no que a vacinas de mRNA contra o cancro diz respeito, fazendo-se um enquadramento histórico do tema, desafios encontrados e ultrapassados, ensaios clínicos realizados bem como perspectivas futuras. Para tal, a metodologia utilizada na procura de informação baseou-se essencialmente na utilização da base de dados “Pubmed” bem como websites de diversas organizações como a DGS, liga portuguesa contra o cancro e a OMS. Com o objetivo de restringir o número de artigos a analisar selecionei apenas os mais recentes, de forma a apresentar informação o mais atualizada possível, bem como aqueles que apresentavam resultados mais promissores.

Analisando a informação recolhida podemos concluir que a utilização de vacinas de mRNA contra o cancro está ainda numa fase precoce de desenvolvimento, no entanto, estudos realizados utilizando esta tecnologia têm obtido resultados bastante promissores, deixando a comunidade científica muito confiante no sucesso e eficácia desta nova abordagem terapêutica.

Palavras-chave: Vacina, RNA, cancro, imunoterapia, células dendríticas, protamina, lipossoma, imunidade

Abstract

The Cancer, described as an abnormal proliferation of cells, is a leading cause of death in the world, causing loss of life to millions of people every year. This fact shows the urgent need to find effective cures against cancer in order to reduce their mortality rate.

Therefore, this monograph attempts to show what has been done in mRNA vaccine area against cancer, becoming a historical framework, overcome obstacles, clinical trials, results and future prospects. For this purpose, the methodology used in information search was based primarily on the use of “Pubmed” and sites of various organizations such as DGS, Portuguese League Against Cancer and the WHO. In order to restrict the number of articles for analysis I selected only the most recent in order to present the most current information possible, as well as those with more concrete results.

Analyzing available information we can conclude that the use of mRNA cancer vaccine is still at an early stage of development, however studies using this technique have achieved promising results, leaving scientific community very confident in the success and efficiency of this new methodology.

Key-words: Vaccine, RNA, cancer, immunotherapy, dendritic cells, protamine, liposome, immunity

I. Introdução

Segundo a OMS, o cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial estimando-se que, só no ano de 2012, tenham sido registadas 8,2 milhões de mortes e detetado o aparecimento de 14 milhões de novos casos esperando-se que, nas próximas duas décadas, o número de aparecimento de novos casos, por ano, suba para os 22 milhões. Em Portugal, só no ano de 2009 registaram-se, por cada 100 mil habitantes, o aparecimento de 426 novos casos de tumores malignos (1) estimando-se que cerca de 25 mil pessoas morram anualmente no nosso país devido a esta doença (2). Tais números revelam a urgência em encontrar novas terapias efetivas contra o cancro, nas quais se incluem vacinas de mRNA.

No tratamento de doenças como o cancro é essencial recorrer-se a combinação de terapias como radiação, quimioterapia, anticorpos monoclonais, terapia hormonal, terapia com vacinas, etc. que, quando usadas concomitantemente, permitem a obtenção de efeitos sinérgicos ou aditivos, alcançando-se assim uma maior eficácia no combate à doença. O grande desafio na combinação de terapias é encontrar a calendarização e dosagens perfeitas a administrar de modo a induzir efeitos positivos e evitar a ocorrência de efeitos adversos. Dentro das terapias mais utilizadas a quimioterapia continua a ser a primeira linha no tratamento de muitas malignidades tendo, inclusivamente, investigação científica recente demonstrado que esta pode agir sinérgicamente com a imunoterapia (3). Assim sendo, realizou-se um estudo clínico no qual se testou a combinação de vacinas de mRNA com um agente quimioterapêutico muito usado: docetaxel. Apesar de o docetaxel ter sido aprovado para o tratamento de carcinoma da próstata há vários anos não existe, atualmente, nenhum “padrão de ouro” quanto a doses e calendarização a usar no tratamento e, nesse sentido, realizou-se um estudo no qual se utilizou docetaxel na dose de 25mg/kg, dose esta que corresponde à dose aprovada pela FDA em humanos. Após a administração de três vacinações com a vacina de mRNA seguiu-se a administração intraperitoneal de docetaxel numa única dose tendo-se, três dias após esta vacinação, procedido à administração de várias vacinações com vacina de mRNA (3). A combinação da vacina de mRNA com docetaxel levou a um atraso significativo no crescimento tumoral em comparação com a administração da vacina de mRNA ou docetaxel isoladamente.

O estudo das vacinas de RNA em animais iniciou-se no início da década de 90 juntamente com o estudo de vacinas de DNA. Através da injeção direta de mRNA e plasmídeo de DNA no músculo esquelético de ratos obteve-se a expressão das proteínas

codificadas e a indução de respostas imunológicas, factos estes que despertaram o interesse da comunidade científica. No entanto, nessa altura, o desenvolvimento da vacina de mRNA não foi considerado possível devido a várias incertezas em relação à instabilidade do RNA e à produção em larga escala. Como resultado, o DNA tornou-se o foco principal no estudo e desenvolvimento de vacinas de ácidos nucleicos nas décadas seguintes. Apesar de todos os esforços realizados, as vacinas de DNA mostraram potência insuficiente em humanos facto este que, aliado aos desenvolvimentos tecnológicos no que à química e biologia do RNA dizem respeito bem como ao facto de se terem demonstrado progressos em relação aos problemas de instabilidade e produção em larga escala, levaram a comunidade científica a concentrar a sua atenção novamente no desenvolvimento da tecnologia de RNA, nomeadamente vacinas de RNA (4). O RNA apresenta a grande vantagem de combinar um conjunto de características que o tornam um produto farmacêutico único (Tabela 1).

Tabela 1: Vantagens do RNA (5).

<ul style="list-style-type: none"> • Não integração no genoma. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não indução de auto-anticorpos.
<ul style="list-style-type: none"> • Produção de antigénios e o aumento da expressão de proteínas terapêuticas são auto-limitados <i>in situ</i>, localizados e de curta duração. 	<ul style="list-style-type: none"> • Indução tanto da imunidade mediada por células como da imunidade humoral, estimulando respostas das células T (incluindo linfócitos T citotóxicos) e B.
<ul style="list-style-type: none"> • Respostas imunológicas direcionadas apenas para os antigénios de interesse. 	<ul style="list-style-type: none"> • Segurança e simplicidade.
	<ul style="list-style-type: none"> • Rápida produção.

Assim, o principal objetivo das vacinas imunoterapêuticas é a indução e perpetuação de respostas imunes específicas anti-tumorais; como consequência, o organismo deve-se livrar de células tumorais e, para além disso, o sistema imune deve prevenir o reaparecimento do tumor.

1.1. mRNA: interesse académico e empresarial

As terapêuticas baseadas em mRNA têm suscitado nos últimos anos um enorme interesse por parte da comunidade científica, sendo prova disso o crescente número de pedidos de patentes referentes a estas terapêuticas realizados essencialmente por pequenas

empresas biotecnológicas mas também por grandes empresas farmacêuticas e instituições académicas. Nos últimos anos, diversas universidades norte-americanas têm inaugurado centros de investigação única e exclusivamente focados no desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas usando RNA, das quais são exemplo o *RNA Therapeutic Institute at the University of Massachusetts*, o *Yale Center for RNA Science and Medicine*, entre outros. Diversas empresas académicas *spin-off* como a Moderna, Ethris, CureVac GmbH, Onkaido, BioNTech, Argos therapeutics, entre outras, têm obtido resultados promissores que lhes permitiram estabelecer acordos com grandes empresas farmacêuticas de que são exemplo o acordo estabelecido entre a AstraZeneca e Moderna (negócio realizado no ano de 2013 e que envolveu 240 milhões de dólares), Shire e Ethris no ano de 2013, Sanofi e CureVac GmbH em 2014, Shire e Moderna (negócio realizado no ano de 2014 e que envolveu 100 milhões de dólares), etc. (6). Outras indicações do crescente interesse nesta terapêutica é o facto de a Novartis ter criado recentemente o seu próprio departamento dedicado a vacinas de mRNA, mais propriamente ao uso de mRNA replicativo, bem como o facto de se ter realizado no mês de Outubro de 2013, na Alemanha, a primeira conferência internacional de mRNA (7).

Já falámos no início que existem diversas empresas académicas *spin-off* dedicadas ao desenvolvimento de mRNA com utilidade terapêutica, no entanto, a primeira de todas foi a CureVac GmbH que se dedicou essencialmente ao fabrico do mRNA bem como ao controlo do produto acabado. Só no ano de 2014 a empresa estabeleceu acordos com grandes indústrias farmacêuticas sendo disso exemplo o acordo com a Sanofi para vacinas anti-virais e o acordo com a Boehringer Ingelheim para vacinas contra o cancro do pulmão (8).

Graças ao contributo da CureVac GmbH e de outras empresas, alguns obstáculos como a implementação de BPFs na produção e a evidência de funcionalidade em humanos foram ultrapassados, tendo-se conseguido também realizar ensaios clínicos usando mRNA a uma escala global (vários estudos multicêntricos têm sido realizados na Europa e nos Estados Unidos da América) (9). No entanto, é necessária ainda a realização de uma maior investigação com o intuito de aumentar a eficácia desta nova tecnologia.

1.2. Regulamentação

A autoridade responsável pela regulamentação das terapias medicamentosas na União Europeia é a EMA que regulamenta não só as terapias convencionais como também as terapias avançadas (medicamentos produzidos a partir de genes ou células). Dentro das terapias avançadas existem quatro grupos principais que são: terapia génica (inserção de genes recombinantes nas células), terapia de células somáticas (manipulação de células ou

tecidos de modo a alterar as suas características biológicas), engenharia de tecidos (alteração de células ou tecidos com o objetivo de reparar, regenerar ou substituir determinado tecido) e terapia avançada combinada (por exemplo, incorporação de células numa matriz biodegradável).

Desde 30 de Dezembro de 2008 que existe na União Europeia uma legislação direcionada para a regulamentação de terapias avançadas que visa promover uma maior investigação e desenvolvimento nesta área através da prestação de incentivos financeiros e logísticos às empresas. Assim, a EMA criou o CTA que é nada mais nada menos do que o comité responsável pela avaliação das terapias avançadas; este comité tem como funções a classificação da terapia, elaboração de um documento que aborde a qualidade, eficácia e segurança da mesma, prestação de aconselhamento científico às empresas bem como a criação de um ambiente que promova a investigação e desenvolvimento destas terapias inovadoras (10). Segundo a diretiva 2009/120/EC da União Europeia, a administração *in vivo* de fármacos de RNA é considerada como terapia génica enquanto que a transfeção *ex vivo* de DCs com mRNA IVT, antes da administração nos pacientes, é considerada como terapêutica de células somáticas (6).

2. Vacinas de mRNA

Ao longo das últimas décadas, as vacinas comercializadas (inativadas, atenuadas ou vacinas de subunidade) foram usadas com sucesso na prevenção de doenças infecciosas onde a imunidade humoral era considerada a proteção primária. Contudo, essas vacinas apresentam limitações no combate a doenças crónicas onde a resposta imunitária mediada por células é considerada necessária para o controlo da infeção. Imunidade celular inclui as CTLs que têm a capacidade de destruir o reservatório celular de patógenos, atingindo diretamente as células-alvo infetadas com o vírus, contrapondo a neutralização ou morte do agente causal (vírus ou bactéria) que são geralmente alcançados através da imunidade humoral (anticorpos neutralizantes) (11). Um objetivo comum em qualquer tipo de vacinação terapêutica do tumor é a indução de células T efectoras específicas das células tumorais de modo a reduzir a massa tumoral e a induzir memória imunológica, prevenindo assim a ocorrência de recidivas (12,13). Para a eficiente indução de CTLs, o antígeno necessita de entrar na rota endógena de processamento antigénico o que requer o transporte das proteínas patogénicas para o citosol que é nada mais nada menos do que o local onde o processo proteossómico ocorre. De seguida, os péptidos resultantes são transportados para dentro do retículo endoplasmático onde os péptidos antigénicos se ligam a moléculas do MHC classe I. O complexo MHC classe I/péptidos é então transportado para

a superfície da célula de modo a ser reconhecido pelos linfócitos T CD8⁺ (11). Existem duas maneiras de associar os péptidos ao MHC. MHC classe I envolve proteínas produzidas no interior das células que foram clivadas por proteossomas no citosol e associadas com moléculas MHC classe I no retículo endoplasmático; MHC classe II envolve proteínas extracelulares que foram endocitadas e processadas por lisossomas (14). Vacinas baseadas em ácidos nucleicos têm sido consideradas adequadas para a formação de respostas CTLs potentes uma vez que elas permitem a expressão da proteína codificada no citosol da APC alvo.

À semelhança do plasmídeo de DNA e dos vetores virais, o mRNA pode ser usado para transportar informação genética exógena para dentro das células com o objetivo final de desencadear uma resposta imune contra a proteína codificada.

De um modo resumido, o processo de fabrico de mRNA é bastante simples, iniciando-se com a linearização, purificação e transcrição *in vitro* do plasmídeo que codifica a proteína desejada bem como das sequências reguladoras (cauda poly(A) e UTRs), usando para isso uma RNA polimerase reconhecedora do promotor bacteriófago. Os resíduos de DNA do plasmídeo são removidos através da utilização de uma DNase, realizando-se de seguida a purificação do RNA recombinante através de técnicas como a precipitação ou cromatografia (15).

Os obstáculos na produção de DNA são essencialmente causados pelo facto de o plasmídeo ser extraído de bactérias sendo assim contaminado com mais ou menos DNA bacteriogenómico, o que não acontece com o RNA uma vez que este é produzido por RNA polimerases que reconhecem sequências promotoras específicas totalmente desprovidas de material genómico bacteriano. O uso de vacinas de RNA parece muito mais viável devido ao facto de não necessitar de alcançar muitas células-alvo para exercer um efeito biológico, bastando ativar o *trigger* apropriado para desencadear uma resposta em cascata, o que levará à obtenção de uma resposta efetiva (5). De facto, vacinas de mRNA têm demonstrado em humanos resultados nesse sentido e têm sido observados resultados promissores em fases mais tardias de ensaios clínicos referentes ao combate do cancro.

Para uma vacina de RNA ser funcional necessita de possuir duas características essenciais que são expressar localmente os antigénios, facilitando-se assim a apresentação dos mesmos por parte das moléculas MHC e, não menos importante, possuir um compromisso dos PRRs de modo a se obter uma estimulação da imunidade inata, alcançando-se assim uma potenciação das respostas imunes específicas do antigénio (16). Além disto, é essencial que a célula tumoral tenha a capacidade de processar os TAAs no

contexto dos MHC e que exista uma elevada especificidade dos TAAs para o tumor, evitando-se assim que estes sejam processados por células normais.

O sucesso clínico de uma vacina depende essencialmente de uma boa imunodisponibilidade dos epítopos na superfície das APCs para, deste modo, se obter uma reação imunogénica e respetiva ativação do sistema imunitário.

2.1. Tipos de RNA

Atualmente existem dois grandes grupos de vacinas de mRNA baseadas na capacidade auto-replicativa do mesmo que são o grupo convencional (moléculas de mRNA que não se auto-replicam) e o grupo do mRNA auto-replicativo ou replicões provenientes de um vetor viral de RNA que mantêm a atividade auto-replicativa.

Moléculas de mRNA não-replicativas usadas nas vacinas de mRNA são constituídas essencialmente por cinco elementos que são uma estrutura *cap*, uma 5'-UTR que se situa imediatamente acima do codão de início de tradução, uma ORF que codifica o gene de interesse, uma 3'-UTR e, por fim, uma cauda formada por 100-250 resíduos de adenosina (cauda poly (A)). Todos os cinco elementos do mRNA controlam a síntese da proteína uma vez que influenciam a sua estabilidade, acesso aos ribossomas bem como a circulação e interação com a maquinaria de tradução (17).

As vantagens da utilização de mRNA convencional são a sua simplicidade, pequeno tamanho em comparação com moléculas auto-replicativas (2-3 kb vs 9-10 kb) bem como a ausência de qualquer proteína codificada adicional, o que exclui a possibilidade de se aumentarem respostas imunes indesejadas ou interações com o hospedeiro (18). Contudo, devido ao curto tempo de meia-vida e instabilidade do RNA, o nível de expressão é geralmente baixo.

Outro tipo de mRNA é o mRNA auto-replicativo cujo grande objetivo passa por prolongar a duração e magnitude da expressão do gene de interesse. O mRNA auto-replicativo é considerado maior (9-10 kb) que o mRNA não-replicativo e contém os mesmos elementos básicos que este último. As moléculas de mRNA auto-replicativas melhor estudadas provêm de genomas de alphavírus incluindo Sindbis e o vírus da encefalite equina venezuelana. Os alphavírus compreendem um grupo de pequenos vírus de RNA de cadeia positiva que, durante o seu ciclo natural de replicação no citosol da célula hospedeira, produzem uma grande quantidade de RNA que codifica proteínas estruturais virais (17); a sua entrada nas células é independente da endocitose, pH ácido e fusão das membranas, sendo iniciada através de uma ligação do vírus a recetores específicos; de seguida, esta

interação irá despoletar rapidamente uma alteração na conformação da membrana viral, culminando com a formação de poros transmembranares. Deste modo, o vírus poderia injetar o seu genoma de RNA diretamente para dentro do citosol da célula, sendo este um sistema muito utilizado por vários vírus não-envelopados para a infeção (17).

Vacinas de RNA auto-replicativas possuem várias características atrativas que não são apresentadas pelas vacinas de mRNA convencional nomeadamente o facto de a sua capacidade auto-replicativa ser capaz de manter um elevado nível de expressão do gene de interesse codificado nas células hospedeiras, independentemente da divisão celular, bem como o facto de a duração de expressão das suas moléculas poder chegar a quase 2 meses *in vivo* (19).

2.2. Administração do RNA: formulações injetáveis

2.2.1. DCs

A principal função das DCs é transportar antígenos do seu local de entrada no organismo para os órgãos linfóides, principalmente a região paracortical (abundante em células T), e processar o antígeno de modo a que este possa ser reconhecido pelas células B e T, embora também desempenhem outras funções como aumentar a expressão de moléculas dos MHC classes I e II, algumas moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 bem como moléculas de adesão como o CD209.

Devido às preocupações relacionadas com a estabilidade do RNA *in vivo*, as tentativas iniciais para usar mRNA como vacina para alvejar APCs consistiram numa abordagem *ex vivo*, nomeadamente através da utilização de DCs. Assim sendo, o processo iniciava-se com a remoção de DCs do hospedeiro ao que se seguia a transfeção das mesmas com o mRNA codificador do antígeno de interesse procedendo-se, por fim, à sua recolocação no hospedeiro. O mRNA foi usado preferencialmente nesta abordagem uma vez que é prontamente e especificamente captado pelas DCs e, para além disso, fornece sinais que ativam as mesmas e induzem a maturação e ativação de células T (14). Esta abordagem foi extensivamente estudada como terapia contra o cancro não só em animais como também em alguns ensaios com humanos. Muitos investigadores transfetaram DCs com determinados antígenos/proteínas que são geralmente associados a tumores.

A utilização de vacinas de RNA baseadas em DCs é uma estratégia promissora para o tratamento de pacientes com leucemia mielóide aguda tendo-se inclusivamente, por esse motivo, realizado um estudo que começou pela produção de DCs maduras, em apenas 3 dias; estas DCs foram posteriormente transfetadas com RNA codificador dos antígenos

tumorais (proteína tumoral Wilm 1) associados à leucemia mieloide aguda e preferencialmente expressos em melanomas, de modo a estimular uma resposta imune baseada em células T específica da leucemia mieloide aguda. No final obtiveram-se respostas imunes específicas do tumor tanto em estudos *in vitro* como em estudos *in vivo* (20).

Enquanto certos tumores têm associado um antigénio específico cuja inibição resulta numa diminuição/remoção do tumor, em muitos cancros isto não se verifica e, com o objetivo de contrariar esta falta de antigénio associado, alguns investigadores transfetaram mRNA total a partir de tumores extraídos. Assim, usou-se esta abordagem em pacientes com CCR e verificou-se a formação de CTLs tanto para o tumor original como para os tumores metastáticos (21) enquanto que, num outro estudo, conseguiu-se induzir uma regressão de metástases, em ratos, através da injeção de DCs transfetadas com mRNA proveniente de tumores primários dissecados (22).

O RNA é obtido através de amostras de tecidos tumorais que são classificados histologicamente como carcinoma por um patologista experiente. Estas mesmas amostras são de seguida transportadas para o laboratório numa solução conservadora de RNA para, de seguida, se proceder à produção do mesmo. Este RNA é obtido através de culturas celulares primárias sendo de seguida incubado e, no final, recorre-se à utilização de um kit próprio (por exemplo o RNeasy kit) para se obter o RNA celular total.

Uma outra alternativa para combater esta falta de antigénio associado consiste na utilização de moléculas que estejam presentes na maioria dos tipos de cancro existentes, sendo disso exemplo a TERT, que é expressa em 85% deles. Neste sentido, um estudo realizado demonstrou que DCs transfetadas com mRNA codificando a TERT podem invocar respostas CTL específicas (14) *in vitro* no entanto, de modo interessante, respostas tumorais induzidas por DCs carregadas com mRNA de lisado tumoral bem como as respostas naturais tumorais contêm imunidade específica TERT potente, o que sugere que a imunidade natural a tumores contém atividade anti-TERT.

MUC-1 é uma glicoproteína cuja sobreexpressão está associada à existência de tumores entre os quais o cancro da mama. A capacidade dos fármacos imunoterapêuticos de aceder às células tumorais é inibida pela glicosilação pesada do domínio extracelular da MUC-1. Além do mais, estas glicoproteínas impedem estereoquimicamente a ligação das células do sistema imunitário aos recetores presentes na superfície das células cancerígenas. Assim, atualmente recorre-se à administração de vacinas de mRNA que codifiquem MUC-1 com o objetivo de treinar as células T do sistema imunitário a procurarem e destruírem células que possuam um marcador específico de MUC-1. Nesse sentido, realizou-se um

estudo no qual se injetaram ratos com duas doses de DCs transfetadas com RNA codificando MUC-I por via subcutânea, tendo-se verificado uma eliminação de tumores expressores de MUC mas não de tumores não-expressores de MUC (23). Importa referir que a administração de vacinas de mRNA não-específicas do tumor deverá, à partida, desencadear um maior número de efeitos adversos em comparação com vacinas de mRNA específicas do tumor.

2.2.2. RNA puro

A administração de RNA puro diz respeito ao método mais simples de administração de RNA que consiste única e exclusivamente na injeção de RNA em doses adequadas (Tabela 2) codificando o antigénio/proteína de interesse, sem recorrer à associação do mesmo com qualquer outro tipo de composto. A maior limitação do mRNA puro (*naked*) é o facto de ter um tempo de vida no meio extracelular demasiado curto devido à sua rápida degradação por parte das RNAses (24).

2.2.3. RNA associado a protamina

A complexação de mRNA com protamina (que é uma proteína rica em arginina) é uma outra estratégia recentemente usada que aumenta a estabilidade da molécula de mRNA, permitindo também aumentar a expressão do antigénio, estimular o sistema imune inato bem como ativar células B, monócitos e células NK (25). Diversos ensaios clínicos têm sido realizados usando esta estratégia (Tabela 2).

2.2.4. Abordagem *gen-gun*

Diversos ensaios clínicos têm sido realizados usando esta abordagem (Tabela 2) que, de um modo simplificado, recorre a partículas de ouro para realizar o transporte de moléculas de RNA através da pele; após a incorporação das mesmas pelas DCs, as proteínas codificadas são expressas e apresentadas às células T (26).

2.2.5. Encapsulação em lipossomas

Outra estratégia consiste na encapsulação do RNA em lipossomas que não só ativam células imunes como também, devido ao facto de conterem lípidos catiónicos, interagem electrostaticamente com moléculas de ácido nucleico carregadas negativamente, formando-se assim complexos estáveis (26). Vários estudos têm sido realizados utilizando esta estratégia (Tabela 2).

Tabela 2: Estudos utilizando diferentes tipos de RNA (17).

Tipo de RNA	Formulação e dose	Resultados
mRNA puro	Administração intradérmica e intranodal nas doses de 25 µg e 20 µg, respectivamente, em ratos	Boas respostas de células T CD8+ e CD4+
mRNA complexado com protamina	Administração intramuscular e subcutânea de 20 µg em ratos e 750 µg (3 doses de 250 µg) em porcos	Estabilização do RNA e obtenção de respostas imunes humoral e mediada por células
Abordagem <i>Gene-gun</i>	1,6 µm de partículas de ouro revestidas com RNA complexado com espermidina	Redução da metástase no pulmão em grupos não controlados
Encapsulação com lipossomas	mRNA encapsulado em lipossomas de fosfatidilserina, fosfatidilcolina e colesterol e administrado pelas vias intraperitoneal, intravenosa e subcutânea na dose de 12 µg em ratos	Obtenção de respostas CTL em mRNA encapsulado quando administrado pelas vias subcutânea ou intravenosa mas não quando administrado por via intraperitoneal

2.2.6. Vacina de mRNA de dois componentes

Tal como acabamos de observar, nos dias de hoje existem vacinas que possuem na sua composição mRNA puro, mRNA complexado com protamina, etc. No entanto, atualmente, existem vacinas inovadoras que possuem na sua composição uma mistura de mRNA puro e mRNA complexado com protamina, sendo conhecidas pela comunidade científica por vacinas de dois componentes. De um modo geral, estas vacinas procuram obter rapidamente fortes respostas imunes, sendo capazes de induzir fortes respostas de células T duas semanas após a administração de apenas duas vacinações (3). Nesta linha, consegue-se duplicar o número de células T específicas do antígeno através da administração de 4 vacinas em 10 dias o que prova que as respostas das células T podem ser melhoradas de modo eficiente num curto período de tempo, o que não se verifica em muitas outras vacinas. Além disto, estas vacinas conseguem induzir a expressão de um vasto número de genes no local do tumor, genes estes que estão conetados com a quimiotaxia das

células do sistema imunológico do local tumoral, bem como ativar células NK, contribuindo assim para um maior efeito anti-tumoral (3) (Tabelas 3 e 4).

Analisando a expressão de genes do tecido tumoral podemos constatar que, após a vacinação, as células NK podem ser recrutadas para o local do tumor e que, após a diminuição das células NK1.1-positivas, o efeito anti-tumoral da vacina é parcialmente reduzido, o que representa bem a importância que estas células têm no efeito anti-tumoral induzido pelas vacinas de dois componentes. De um modo geral, espera-se que os efeitos desencadeados pelas células NK nos ensaios pré-clínicos com modelos animais tenham a mesma importância quando da sua utilização em humanos.

Num outro estudo procedeu-se à administração de vacina de mRNA de dois componentes contra o cancro da próstata, denominada vacina CV9103, que contém mRNA a codificar o PSA, antígeno membranar específico da próstata, antígeno das células estaminais da próstata e STEAPI. Na fase I deste estudo, três doses diferentes de mRNA total foram administradas em 12 pacientes (dois grupos de 3 e um grupo de 6 elementos) com o objetivo de determinar a dose recomendada. Na fase II, outros 32 pacientes foram administrados com a dose recomendada (1280 µg); 26 desses pacientes desenvolveram uma resposta imune, das quais 15 foram diretamente contra os antígenos administrados. Como principais efeitos secundários observados podemos destacar eritema no local de injeção, febre e fadiga (27).

2.3. Comparação dos dois métodos de vacinação mais comuns usando mRNA

A administração de vacinas de mRNA pode ser realizada utilizando diferentes métodos, no entanto, os dois métodos mais utilizados são a administração injetável de mRNA puro e a administração de células (por exemplo DCs) que foram previamente transfetadas em laboratório (*in vitro*). Ambos os métodos apresentam vantagens e desvantagens (Tabela 5). Importa referir que tanto um como o outro têm sido avaliados em ensaios clínicos em humanos.

Tabela 5: Vantagens e desvantagens da injeção direta de mRNA e utilização de DCs (28).

Injeção direta de mRNA	
Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Produção a baixo preço 	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de meia-vida baixo <i>in vivo</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser administrado em doentes de ambulatório e a um grande grupo de pacientes 	<ul style="list-style-type: none"> • Imunização intralinfática é mais eficiente usando um procedimento invasivo
<ul style="list-style-type: none"> • Existe um procedimento minimamente invasivo (via intradérmica) 	<ul style="list-style-type: none"> • Efeito adjuvante do mRNA é inferior comparativamente com a utilização de DCs
Utilização de DCs	
Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente “carregamento” de RNA por parte das DCs 	<ul style="list-style-type: none"> • Logisticamente é um processo complicado
<ul style="list-style-type: none"> • Eficácia da transfeção das DCs pode ser controlada 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevados custos devido à utilização de cultura celular cumprindo BPFs
<ul style="list-style-type: none"> • Doses intracelulares elevadas podem ser alcançadas 	<ul style="list-style-type: none"> • O melhor fenótipo das DCs a usar ainda não está bem definido
<ul style="list-style-type: none"> • Existe um procedimento minimamente invasivo disponível (via intradérmica) 	<ul style="list-style-type: none"> • Farmacocinética complexa e difícil de controlar (migração das DCs para os nódulos linfáticos, etc.)
<ul style="list-style-type: none"> • DCs autólogas são bem toleradas 	

3. Como aumentar a eficácia terapêutica

A farmacocinética de uma vacina de mRNA é afetada por fatores como a estabilidade do meio intracelular, eficácia translacional da molécula (fator este que pode ser aumentado através de alterações no mRNA), local e modo de administração, calendarização das suas tomas por parte do utente e, por fim, a dose. Ainda não existe um consenso por parte da comunidade científica em relação ao local preferencial para se injetar o RNA, no entanto considera-se que injeções nos nódulos linfáticos ou em zonas próximas destes permitem induzir fortes respostas imunes (26).

O mRNA puro estimula os TLRs que são nada mais nada menos do que um tipo de PRR presente nas DCs (29). A tecnologia do mRNA já consegue também codificar moléculas imunomoduladoras como por exemplo CD40L, CD70, OX40L e GM-CSF, conseguindo mesmo ligá-las ao antígeno na estrutura do RNA de modo a transportá-las para dentro das APCs. A co-administração de mRNA codificando o antígeno de interesse com mRNA codificando moléculas imunoestimuladoras parece aumentar a eficácia das respostas antitumorais. Neste sentido, foi usada uma mistura de mRNA codificando os ligandos CD40, TLR4 e CD70 (Trimix) para adjuvar na libertação intranodal de mRNA antigénico associado ao tumor, tendo-se observado um aumento das respostas CTL e um aprimorar das respostas antitumorais em comparação com vacinas de mRNA sem adjuvantes (30). Contudo, a co-administração da vacina de mRNA com o Trimix ainda resulta numa baixa expressão da proteína, o que nos indica que mecanismos neutralizantes como por exemplo o IFN tipo I são ativados.

É sabido que durante uma infeção local as citocinas e quimiocinas produzidas atraem DCs e outras APCs, alcançando-se assim um aumento do número de antígenos que são processados para, posteriormente, serem apresentados às células B e T, obtendo-se deste modo melhores respostas. A administração da vacina de mRNA *in vivo* não desencadeia a atração de DCs para o local de injeção o que sugere que o uso de citocinas e quimiocinas ou a possibilidade de se administrar mRNA que codifique citocinas e quimiocinas seria benéfico pois levaria à atração de DCs para o local de entrega de mRNA, promovendo-se assim o aparecimento de melhores respostas imunes (14).

Uma estratégia para eliminar mecanismos inibitórios do sistema imune consiste em inibir o CTLA-4 que é homólogo das moléculas coestimuladoras B7 e um regulador negativo da proliferação das células T. À semelhança das moléculas B7, o CTLA-4 liga-se às CD28, no entanto, a sua afinidade com as CD28 é maior em comparação com as B7 o que conduz a uma diminuição da proliferação das células T (26). O Tremelimumab e Ipilimumab são anticorpos anti-CTLA-4 humanos, usados no tratamento de melanoma, cuja utilização em ensaios clínicos envolvendo pacientes com melanoma levou à ocorrência de melhores respostas clínicas por parte dos mesmos (31), no entanto, juntamente com esses resultados benéficos promissores, também se verificou a ocorrência de alguns efeitos adversos tais como diarreia e tiroidite autoimune. Assim, justifica-se a realização de uma maior investigação no sentido de percebermos melhor estas questões relacionadas com a segurança após a inibição dos CTLA-4.

Para além da inibição de efeitos imunes indesejáveis é possível estimular ainda mais mecanismos que ativem o sistema imune. Nesse sentido, a utilização de compostos como dinucleótidos citosina-guanina não-metilados que são oligodeoxinucleótidos sintéticos homólogos do DNA viral ou bacteriano, desencadeará uma estimulação do TLR9, que é um PRR pertencente à família TLR (32). As células T CD4⁺ desempenham um papel importante na iniciação tanto da imunidade humoral como da imunidade inata, na geração de respostas anti-tumorais efetivas e no estabelecimento de respostas de memória. Assim, uma maior ativação/estimulação das células CD4⁺ poderia potenciar as respostas imunes induzidas pelo mRNA.

Como as moléculas de RNA são muitas vezes elementos essenciais dos patógenos invasores do organismo, o sistema imune inato tem evoluído no sentido de reconhecer nucleótidos de RNA estranhos através dos PRRs. Estes PRRs incluem elementos da família das TLRs localizados nos compartimentos endolisossomais bem como recetores citosólicos capazes de detetar ácidos nucleicos no citoplasma (11). Num estudo realizado foi demonstrado que o reconhecimento *in vitro* do mRNA transcrito por parte dos PRRs ativa o sistema imune inato resultando na secreção de IFN tipo I (11). Além da sua função como elemento ativador do sistema imune inato, o IFN tipo I também estimula a imunidade adaptativa. Surpreendentemente, descobriu-se que quando se usa mRNA para codificar os antígenos da vacina, o IFN tipo I interfere negativamente com a força da resposta das células T.

4. Estabilidade das formulações de mRNA

Um dos grandes problemas das vacinas de mRNA consistia na sua instabilidade devido ao facto de estas serem degradadas com relativa facilidade. Assim, é importante perceber um pouco melhor o motivo pelo qual isso acontecia. Em primeiro lugar, o mRNA é geralmente considerado uma molécula instável devido à presença de um grupo hidroxilo na posição 2' da ribose o que faz com que a hélice da molécula adote uma geometria que lhe confere alguma instabilidade (15). Além disto, o RNA é conformacionalmente uma molécula mais flexível o que faz com que a ligação fosfodiéster do RNA seja quebrada por transesterificação intramolecular, processo no qual o grupo hidroxilo 2' da ribose ataca a estrutura do fosfato, levando à quebra da cadeia. O recurso a técnicas de liofilização ou congelação pode ser a solução para se obterem formulações de RNA estáveis e, nesse sentido, num estudo procedeu-se à liofilização de RNA auto-replicativo em trealose, tendo-se observado que este se manteve estável durante 10 meses quando armazenado a 4 °C. Além deste, outro estudo realizado demonstrou que uma vacina influenza de mRNA

liofilizado manteve-se estável a 37 °C durante 3 semanas (15). Assim sendo, podemos concluir que estabilizar mRNA recorrendo a técnicas de liofilização é um processo viável, no entanto, é necessário a realização de mais estudos de modo a se obter um formato comercial viável.

5. Internalização de mRNA nas células

Ao falarmos de vacinas de mRNA, importa descrevermos o modo como a molécula é captada *in vivo* pelas células. Mais importante do que tudo é essencial que, em primeiro lugar, o RNA evite a ação das RNAses de modo a chegar intacto às células-alvo. De seguida, o maior obstáculo com que se confrontará será ultrapassar a barreira da membrana plasmática uma vez que a sua hidrofobicidade e carga negativa prejudicam a sua captação por parte das células. Para contrariar isto, o RNA pode ser complexado eletrostaticamente com lípidos catiónicos disfarçando assim a sua carga negativa, no entanto, já se observou tanto *in vitro* como *in vivo*, que muitas linhas celulares são capazes de captar mRNA não-replicativo convencional através de endocitose mediada por recetores scavenger em membranas ricas em *rafts* lipídicos (33). De seguida ocorre um processamento lisossomal que pode degradar o RNA devido à ação de nucleases e, por isso mesmo, o mRNA deve deslocar-se para o citosol num processo denominado por “fuga endossomal”.

6. Ensaio clínico

Para estudar a eficácia de determinada abordagem terapêutica nada melhor do que recorrer à realização de ensaios clínicos. Assim sendo, diversos ensaios clínicos referentes a vacinas de RNA têm sido realizados, alguns dos quais usando RNA (puro, associado a protamina, etc) (Tabela 6), utilizando DCs transfetadas com RNA (Tabela 7) e outros utilizando alphavírus. Todos eles apresentam em comum o fato de terem obtido resultados promissores que deixam a comunidade científica confiante de que esta é a abordagem terapêutica indicada para tratar, no futuro, a doença do cancro.

Tabela 6: Ensaios clínicos usando RNA (17).

Tipo de cancro	RNA	Calendarização da vacinação	Nº de indivíduos no ensaio	Resposta imunológica	Resposta clínica
Melanoma	Tumor total	200 µg de RNA puro via intradérmica, 2 vezes por semana durante 8 semanas, seguida de uma injeção mensal durante 6 meses; 150 µg de GM-CSF por via subcutânea 24 horas após a injeção de RNA	15	N.A.	2/13 R.M. 3/13 N.E.D.
Melanoma	Melan-A, tirosinase, gp100, Mage-A1, Mage-A3, <i>survivin</i>	Grupo 1: 3,2-80 µg por antígeno + 128 µg protamina via intradérmica nos dias 1, 3 e 5, semanas 2,3,4,5,6,7,11,15 e 19, 200 µg GM-CSF via subcutânea 24 horas após injeção de RNA; Grupo 2: 3,2-80 µg por antígeno + 128 µg protamina + 4 mg KLH via intradérmica nos dias 1,3 e 5, semanas 2,3,4,5,6,7,11,15 e 19, 200 µg GM-CSF via subcutânea 24 horas após injeção de RNA;	21 Grupo 1: 11 Grupo 2: 10	Vacina dirigida a células T: 2/4	Grupo 1: 1/11 R.C. 4/11 N.E.D. Grupo 2: 1/10 N.E.D.
CCR	MUC-I, CEA, Her-2/neu, telomerase, <i>surviving</i> , MAGE-I	Grupo 1: 20 µg de RNA puro por antígeno via intradérmica nos dias 0, 14, 28 e 42 seguidos de injeções mensais; 100 µg/m ² GM-CSF via subcutânea 24 horas após injeção de RNA; Grupo 2: 50 µg de RNA puro por antígeno via intradérmica nos dias 0-3, 7-10, 28 e 42 seguidos de injeções mensais; 250 µg/m ² GM-CSF via subcutânea 24 horas após injeção de RNA	30 Grupo 1: 14 Grupo 2: 16	CD4+ ELISpot: 3/7; CD8+ ELISpot: 8/9; CD8+ Cr-ensaio de libertação: 7/11	Grupo 1: 1/14 R.P. 6/14 D.E. Grupo 2: 9/16 D.E.

Tabela 7: Ensaios clínicos usando DCs transfetadas com RNA (26).

Tipo de cancro	RNA	Nº de indivíduos no ensaio	Resposta imunológica	Resposta clínica
Próstata	PSA	16	9/9	N.A.
Cerebral	Tumor autólogo total	9	N.A.	2/7 D.E.
Neuroblastoma	Tumor autólogo total	11	N.A.	1/7 D.E.
Próstata	Tumor total proveniente das linhas celulares com cancro da próstata DU145, LNCaP, PC-3	19	12/19	11/19 D.E.
Melanoma	Tumor autólogo total	22	9/19	2/20

D.E.- Doença estável; N.A.-Não aplicável; N.E.D.-Não evidência de doença; PSA-*Prostate Specific Antigen*; R.C.- Resposta completa; CCR – Carcinoma de células renais; R.M.-Resposta mista; R.P.-Resposta parcial.

Diversos ensaios clínicos têm sido realizados utilizando vacinas baseadas em alphavírus sendo disso exemplo um ensaio de fase II, randomizado, duplamente cego e controlado com placebo, no qual se procedeu a uma única injeção subcutânea da vacina viva CHIK (que é um alphavírus) em 59 voluntários, ao passo que 14 indivíduos foram injetados com o placebo. O único efeito adverso detetado foi artralgia transitória em cinco dos pacientes vacinados com CHIK, importando também referir o aparecimento de anticorpos neutralizantes CHIK em 57 indivíduos (98%) 38 dias após a vacinação, tendo 85% deles permanecido seropositivo um ano após a mesma (34).

7. Conclusão

Ao longo dos últimos 25 anos muitos esforços têm sido realizados no desenvolvimento de técnicas imunoterapêuticas, nas quais se inclui a utilização de RNA, com o objetivo de combater um vasto número de doenças, entre elas o cancro. Após muito trabalho, ensaios clínicos recentes apresentaram resultados promissores que suportam a ideia de que a imunoterapia pode contribuir para o tratamento de doenças cancerosas. No que se refere ao cancro, apesar de existir uma grande variedade de estratégias imunoterapêuticas, o objetivo de todas elas é o mesmo: estimular o sistema imune com o intuito de combater a doença. Para induzir uma resposta imune ampla, potente e duradoura,

a vacina ideal contra o cancro deve induzir um elevado nível de expressão de antígenos estáveis, ativar os sistemas imunes inato e adaptativo bem como induzir respostas Th1 e Th2. A indução de respostas de células B bem como a ativação de células T e células de memória irão ser necessárias para se obter um efeito anti-tumoral sustentado. A resposta imune deve ser rápida e eficaz através de vacinações repetidas e a vacina deve evitar a indução de reguladores negativos. Finalmente, e devido ao facto de as hipóteses de se tratar o cancro através de monoterapia serem muito baixas, a vacinação deve ser usada em conjunto com outras terapias tais como quimioterapia, radiação, anticorpos monoclonais, alcançando-se assim um melhor efeito terapêutico.

O sucesso na indução de imunidade das células T através de vacinas de mRNA administradas diretamente *in vivo* apresenta ainda alguns desafios. Em primeiro lugar, os antígenos que codificam o mRNA devem ser direcionados para as APCs antes que ocorra a sua degradação por parte das ribonucleases extracelulares; a seguir à endocitose pelas APCs-alvo, o mRNA deve evitar o compartimento endolisossomal ácido de modo a permitir a tradução do antígeno no citosol; uma vez no citosol, a estrutura do mRNA deve ser suficientemente estável e recrutar eficientemente fatores iniciadores da tradução; além do mais, embora a tradução do antígeno citosólico estimule fortemente as células T CD8+, também se deve verificar um forte estímulo das células T CD4+ de modo a ajudar na indução e manutenção das células T CD8+ específicas do antígeno. Contudo, para além de uma eficiente apresentação do antígeno codificado, é necessário também uma apresentação do antígeno às APCs no correto *status* de ativação. Apesar de as vacinas de mRNA ativarem as DCs através dos PRRs a ativação das mesmas é na melhor das hipóteses moderada, sendo precisamente um desafio das vacinas de mRNA, *in vivo*, o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a otimização da ativação das DCs sem que ocorra interferência na captação e tradução do mRNA.

Assim, ainda há muito a fazer no que a vacinas de mRNA contra o cancro diz respeito, sendo o número de ensaios clínicos com vacinas de mRNA em humanos ainda muito escasso; no entanto, aplicações iniciais baseadas no uso de mRNA contra o cancro demonstraram bons resultados, o que tem deixado a comunidade científica confiante de que este é o caminho a seguir no tratamento desta e de muitas outras doenças.

8. Bibliografia

1. PORTUGAL, Direcção-Geral da Saúde – Portugal – Doenças oncológicas em números – 2014. Lisboa: DGS, 2014.
2. Liga Portuguesa Contra o Cancro: <http://www.ligacontracancro.pt/gca/index.php?id=50> [Acedido a 23/08/2015]
3. FOTIN-MLECZEK, M., ZANZINGER, K., HEIDENREICH, R., LORENZ, C., THESS, A., DUCHARDT, K., KALLEN, K. – Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect. *The Journal of Gene Medicine* 2012; 14: 428-439.
4. KALLEN, K., THEB, A. – A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs. *Ther. Adv. Vaccines* 2014; 2(1): 10-31.
5. GEALL, A., ULMER, J. – Introduction to RNA-based vaccines and therapeutics. *Expert rev. vaccines* 2015; 14(2): 151-152.
6. SAHIN, U., KARIKÓ, K., TURECI, O. – mRNA-based therapeutics – developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2014;1-18.
7. Primeira conferência internacional de mRNA: www.mrn-conference.com [Acedido a 20/08/2015]
8. CureVac GmbH: www.curevac.com [Acedido a 25/08/2015]
9. PASCOLO, S. – The messenger’s great message for vaccination. *Expert rev. vaccines* 2015; 14(2): 153-15.
10. European Medicines Agency: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000504.jsp&mid=WC0b01ac058050f347 [Acedido a 03/09/2015]
11. POLLARD, C., KOKER, S., SAELENS, X., VANHAM, G., GROOTEN, J. – Challenges and advances towards the rational design of mRNA vaccines. *Trends in Molecular Medicine*. Vol.19, nº12 (2013), 705-712.
12. PALUCKA, K., BANCHEREAU, J. – Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* 2012; 12: 265-277.

13. MELLMAN, I. – Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; 480: 480-489.
14. CANNON, G., WEISSMAN, D. – RNA based vaccines. *DNA and cell biology*. Vol.21, n°12 (2002), 953-961.
15. GEALL, A., MANDL, C., ULMER, J. – RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines. *Semin. Immunol.* (2013), 1-7.
16. ULMER, J., MASON, P., GEALL, A., MANDL, C. – RNA-based vaccines. *Vaccine* 30 2012; 4414-4418.
17. DEERING, R., KOMMAREDDY, S., ULMER, J., BRITO, L., GEALL, A. – Nucleic acid vaccines: prospects for non-viral delivery of mRNA vaccines. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2014; 11(6): 885-889.
18. SCHLAKE, T., THESS, A. FOTIN-MLECZEK, M., KALLEN, K.J. – Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA biol.* 2012; 9:19-30.
19. GEALL, A.J., VERMA, A., OTTEN, G.R. – Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109: 4-9.
20. SUBKLEWE, M., GEIGER, C., LICHTENNEGER, F.S., JAVOROVIC, M., KVALHEIM, G., SCHENDEL, D.J., BIGALKE, I. - New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol.* 2014; 63(10): 1093-1103.
21. HEISER, A., MAURICE, M.A., YANCEY, D.R., COLEMAN, D.M., DAHM, P., VIEWEG, J. - Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Research* 2001; 61: 3388-3393.
22. BOCZKOWSKI, D., NAIR, S.K., NAM, J.H., LYERLY, H.K., GILBOA, E. – Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 1028-1034.

23. KOIDO, S., KASHIWABA, M., CHEN, D., GENDLER, S., KUFE, D., GONG, J. - Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J. Immunol.* 2000; 165: 5713-5719.
24. MOCKEY, M. – mRNA based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther* 2007; 14; 802-814.
25. SCHEEL, B., TEUFEL, R., PROBST, J. – Toll-like receptor dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *European Journal of Immunology*. Vol.35, n°5 (2005), 1557-1566.
26. BRINGMANN, A., HELD, S., HEINE, A., BROSSART, P. – RNA vaccines in cancer treatment. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1-12.
27. KUBLER, H., SCHEEL, B., MILLER, K., PARMIANI, G., HAMPEL, C. – Self-adjuvant mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study. *J. Immunother. Cancer* 2015; 3: 26.
28. KREITER, S., DIKEN, M., SELMI, A., TURECI, O., SAHIN, U. – Tumor vaccination using messenger RNA: prospects of a future therapy. *Current Opinion in Immunology* 2011; 23: 399-406.
29. REIS E SOUSA – Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* 2004; 16: 27-34.
30. VAN LINT, S. – Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy. *Cancer Res.* 2012; 7: 1661-1671.
31. RIBAS, A., CAMACHO, L., LOPEZ-BERESTEIN, G. – Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP675206. *Journal of Clinical Oncology*. Vol.23, n°35 (2005), 8968-8977.
32. VOLLMER, J., KRIEG, A.M. – Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol.61, n°3 (2009), 195-204.

33. LORENZ, C., FOTIN-MLECZEK, M., ROTH, G. – Protein expression from exogenous mRNA: uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the lysosomal pathway. *RNA biol.* 2011; 8: 27-36.

34. LUNDSTROM, K. – RNA-based drugs and vaccines. *Expert rev. vaccines* 2014, 1-11.

ANEXO

Tabela 3: Lista de genes ativados após tratamento com uma vacina de dois componentes (3).

Genes	Alteração (vacina vs tampão)	Genes	Alteração (vacina vs tampão)
Relacionados com células NK		Quimiocinas/Citocinas	
Nkg7	+2,9	CXCL9 (MIG)	+ 13,4
Klrc (NKG2A)	+1,8	CXCL10 (IP-10)	+4,6
Klrd1 (CD94)	+1,7	CCL5 (RANTES)	+1,9
Relacionados com células T		IFN gama	+ 1,3
CTLA-4	+ 1,7		
Perforina	+ 1,6		
IL2Rb	+ 1,8		

Tabela 4: Relação existente entre o aumento da expressão de genes em ratos vacinados com mRNA e o respetivo prognóstico no cancro em humanos (3).

Genes	Prognóstico
Relacionados com células NK	A infiltração de células NK no tumor prevê um prognóstico positivo para pacientes com diferentes tipos de tumores (por exemplo, adenocarcinoma pulmonar e carcinoma gástrico)
Relacionados com células T	Infiltração de linfócitos T em diferentes tipos de tumor está relacionado com um prognóstico favorável para pacientes com cancro
CXCL9 (MIG)	Presença de CXCL9 e CXCL10 está relacionado com o aumento do número de células T infiltradas no tumor e um aumento da sobrevivência em pacientes com cancro colorrectal
CXCL10 (IP-10)	
IFN gama	Aumento da expressão de IFN gama promove o aparecimento de resultados clínicos benéficos em pacientes com cancro colorrectal