



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diogo André Ferreira Simões

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células alogénicas CAR-T “Off-the-shelf” como meio para criar um banco de células CAR-T universal: um desafio para o futuro” referentes à Unidade Estágio Curricular, sob a orientação da Dra. Maria Cacilda Lima Natário Lourenço Borges, da Dra.

Sara Farinha e do Professor Doutor João Nuno Moreira apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diogo André Ferreira Simões

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células alogénicas CAR-T *“Off-the-shelf”* como meio para criar um banco de células CAR-T universal: um desafio para o futuro” referentes à Unidade Estágio Curricular, sob a orientação da Dra. Maria Cacilda Lima Natário Lourenço Borges, da Dra. Sara Farinha e do Professor Doutor João Nuno Moreira apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021

Eu, Diogo André Ferreira Simões, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016250761 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células alogénicas CAR-T “Off-the-shelf” como meio para criar um banco de células CAR-T universal: um desafio para o futuro” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 1 de setembro de 2021.

Diogo André Ferreira Simões

(Diogo André Ferreira Simões)

“Where there’s a will, there’s a way”

George Herbert

Agradecimentos

Concluída uma das fases mais importantes da minha vida, surgem recordações de inúmeros momentos e uma nostalgia dos melhores anos da minha vida. Este trabalho é dedicado a todos os que estiveram sempre do meu lado.

Aos meus pais, as duas pessoas mais importantes da minha vida, pelos quais tenho um amor incondicional e que estão sempre presentes em todos os momentos. Tudo o que sou hoje, todos os valores e princípios, são graças a vocês. Espero continuar a orgulhar-vos, sempre. À minha irmã, por toda a paciência e por toda a disponibilidade sempre que é preciso.

À Débora, obrigada por tudo. Tudo o que me ensinas todos os dias, tudo o que fazes por mim sem pensar duas vezes, tudo aquilo que és. Desejo-te a maior sorte do mundo, mereces tudo.

Ao Rafael, ao Joel, ao Hugo, ao Daniel, ao Francisco, por todos os momentos inesquecíveis que vivemos e por todos aqueles que estão por vir. Amizades de sempre que ficarão para sempre.

A todas as pessoas incríveis que conheci nestes cinco anos, aos meus padrinhos, Rita, Rodrigo, Sofia, aos meus companheiros Simão, Costa, Diogo, Luís, Filipe e Mariana. Foi um prazer ter-vos encontrado neste percurso. Espero levar-vos comigo para a vida.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, por todo o conhecimento, apoio e disponibilidade que fazem dele um exemplo enquanto docente.

A toda a equipa da Farmácia Lima Natário e em especial ao Dr. João Tiago Costa, por todos os ensinamentos, amizade e disponibilidade em todos os momentos. São pessoas fantásticas.

À Dra. Sara Farinha por ser uma profissional de excelência que me permitiu aprender tanto em tão pouco tempo, e a todos os elementos da equipa da Abbvie, por toda a ajuda e carinho.

A Coimbra, à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todos os seus docentes.

Obrigado.

Índice

PARTE I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	8
1. Introdução	9
2. A Importância da Farmácia Comunitária	9
3. A Farmácia Lima Natário.....	10
4. Análise SWOT	10
4.1 Pontos Fortes	11
4.1.1 Equipa Técnica - Integração e Acompanhamento.....	11
4.1.2 Atendimento diferenciado	11
4.1.3 Diversidade de funções desempenhadas	12
4.2 Pontos Fracos	12
4.2.1 Dificuldade na associação de nomes comerciais aos princípios ativos	12
4.3 Oportunidades.....	13
4.3.1 Sifarma.MA®	13
4.3.2 Programa Valormed.....	13
4.3.3 Operação Luz Verde	14
4.4 Ameaças	14
4.4.1 Pandemia COVID-19.....	14
4.4.2 Medicamentos esgotados e rateados.....	14
4.4.3 Farmácia concorrente e locais de venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM)	15
5. Casos Clínicos	15
6. Conclusão	18
Referências Bibliográficas	19

Parte 2 - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas.....	22
1. Introdução	23
2. AbbVie	23
3. Departamento de <i>External Affairs & Market Access</i>	24
3.1 SiNATS.....	25
3.2 Avaliação de Tecnologias de Saúde em Portugal	25
3.3 Contratos	27
4. Análise SWOT	27
4.1 Pontos Fortes	27
4.1.1 Equipa de <i>Market Access</i> - <i>AbbVie Way</i>	27
4.1.2 Inductions.....	28
4.1.3 Diversidade de funções.....	28
4.2 Pontos Fracos	29
4.2.1 Teletrabalho	29
4.2.2 Formação em <i>Market Access</i> e Farmacoeconomia.....	29
4.3 Oportunidades.....	29
4.3.1 <i>Abbvie Global meetings</i>	29

4.3.2 Produto Rinvoo®	30
4.4 Ameaças	30
4.4.1 Competitividade no mercado de trabalho	30
5. Conclusão	31
Referências Bibliográficas	32

Parte 3 - Monografia

Lista de Abreviaturas.....	34
Resumo.....	35
Abstract.....	36
1. Introdução	37
2. Células CAR-T alogénicas <i>off-the-shelf</i>	39
2.1 A produção de Células CAR-T em perspectiva.....	39
2.2 Ultrapassar as limitações das células CAR-T autólogas	41
2.3 Vantagens das células alogénicas	42
2.4 Desafios das células alogénicas	42
2.5 Prevenção da problemática das células alogénicas	44
2.5.1 Doença <i>Graft-Versus-Host</i>	45
2.5.1.1 Edição de genes	45
2.5.1.2 Células T universais	50
2.5.1.3 Células CAR-T alogénicas derivadas de dador de transplante de células estaminais (TCE)	53
2.5.1.4 Células T de memória vírus-específicas <i>off-the-shelf</i>	54
2.5.2 Rejeição Células CAR-T alogénicas.....	55
2.5.2.1 Expansão células CAR-T alogénicas	56
2.5.2.2 Persistência células CAR-T alogénicas	56
3. Banco de células CAR-T	57
3.1 A importância da criação de um banco de células CAR-T.....	57
3.2 Estratégias para a obtenção de CAR-Ts universais.....	57
3.2.1 Origem das células T.....	58
3.3 A próxima geração de CAR-T	59
4. Panorama atual das células CAR-T	60
4.1 Evolução.....	60
4.2 Ensaios clínicos	64
5. O grande desafio do futuro	67
Referências Bibliográficas	68
Anexo	76

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Lima Natário

Estágio orientado pela Dra. Maria Cacilda Lima Natário Lourenço Borges

Lista de Abreviaturas

ADFP:	Assistência, Desenvolvimento e Formação Profissional
DCI:	Denominação Comum Internacional
EPGSG:	Escola de Pós-Graduação em Saúde e Gestão
FC:	Farmácia Comunitária
FFUC:	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FLN:	Farmácia Lima Natário
IPSS:	Instituições Particulares de Solidariedade Social
MICF:	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM:	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
MNSRM-EF:	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de venda Exclusiva em Farmácia
MSRM:	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
PVP:	Preço de Venda ao Público
SWOT:	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>

I. Introdução

No que concerne ao plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), a unidade curricular “Estágio” surge como uma formação prática obrigatória, a par de uma prévia formação teórica.

Assim sendo, encontra-se de acordo com a Diretiva 2013/55/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013 (Artº 44º, n.º 2)¹. Desta forma, para a obtenção do título de formação de farmacêutico, é obrigatório a realização de um estágio em Farmácia Comunitária (FC).

Chegado o momento de realizar o tão esperado Estágio Curricular em FC e de colocar em prática aquilo que foram os conhecimentos e princípios adquiridos ao longo de um percurso de quatro anos e meio no MICF da FFUC, foi com agrado e carinho que decidi optar pela Farmácia Lima Natário (FLN), farmácia onde já havia realizado um estágio de verão em 2019. O meu estágio curricular decorreu no período de 11 de janeiro a 2 de abril, sob a orientação do Farmacêutico Adjunto Dr. João Tiago Costa e da Diretora Técnica Dra. Maria Cacilda Lima Natário Lourenço Borges.

Mais do que um estágio curricular, esta foi uma experiência que me permitiu viver o que é ser farmacêutico fora dos bancos da faculdade e encarar a importância do nosso papel na sociedade ao aplicar e aprofundar todos os conhecimentos em situações reais e do quotidiano, com o intuito final de dignificar o Farmacêutico enquanto agente de saúde pública.

2. A Importância da Farmácia Comunitária

A atividade do farmacêutico apresenta-se, cada vez mais, como o principal e mais próximo ponto de apoio à generalidade da população, sendo fundamental a sua presença e prestação de serviços junto do utente. Enquanto profissional de saúde, o cerne da sua ação tem como foco o cidadão e o apoio à comunidade. Desta forma, verificamos um espectro muito alargado de funções e atividades exercidas pelo farmacêutico comunitário, o que demonstra o leque de competências necessárias ao farmacêutico da atualidade. Além da competência técnico-científica que permite a promoção de um uso responsável do medicamento, a promoção da literacia em saúde, bem como um aconselhamento diferenciado relativo aos medicamentos de venda exclusiva em farmácia (MNSRM-EF) e medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), também a competência humanística e vocacional possibilita o estabelecimento de uma relação mais próxima com o utente. Neste sentido, o farmacêutico desempenha um papel crucial e impactante no bem-estar e saúde do doente e do cidadão em geral, sendo um dos principais alicerces da saúde pública do nosso país².

3. A Farmácia Lima Natário

A escolha pela FLN prevaleceu por diversos fatores, entre eles o facto de ter estabelecido previamente uma relação próxima com a respetiva equipa técnica e o ambiente profissional ter-se tornado propício para a aquisição de conhecimentos e competências. Outro fator diferenciador foi a proximidade aos utentes que frequentam a FLN, derivado ao facto de apenas existirem duas farmácias em Miranda do Corvo, o que leva a uma relação de confiança com a população local.

É de salientar a participação da farmácia em vários projetos como o *Valormed* através da sensibilização dos utentes para as boas práticas ambientais e da receção de resíduos de embalagens e restos de medicamentos fora de uso ou prazo de validade³. Além do *Valormed*, a FLN também integra o projeto Operação Luz Verde que consiste na entrega de medicamentos hospitalares na farmácia para evitar a deslocação desnecessária dos doentes ao hospital⁴.

Tendo em perspetiva o panorama em que se encontrava o país e o mundo devido ao agravamento da pandemia, o estágio esperava-se desafiante e exigente. Face à dificuldade de estabelecer contacto com as instituições hospitalares, centros de saúde e respetivos médicos, foi na farmácia que muitos utentes procuraram aconselhamento e a solução para os mais diversos problemas, o que salienta a relevância do serviço prestado pelo farmacêutico. Além dos serviços de aconselhamento farmacêutico, a FLN disponibiliza serviços de preparação de manipulados, administração de vacinas e injetáveis, aconselhamento dermocosmético e medição de parâmetros analíticos.

É, ainda, de realçar que tive a oportunidade de interagir com o sistema informático clássico Sifarma 2000®, com o Sifarma Clínico®, bem como com a sua versão mais recente Sifarma Módulo de Atendimento (Sifarma.MA®), ambos comercializados pela Glintt®⁵. Foi após me ter familiarizado com estes *softwares* que fui capaz de assumir funções como atendimento ao balcão, receção de encomendas, aconselhamento farmacêutico de cada utente, controlar *stocks* e prazos de validade, gerir devoluções e participar na preparação de inventários.

4. Análise SWOT

No que diz respeito ao presente relatório de estágio, foi elaborada uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) com o objetivo de fazer uma introspeção do estágio e, desta forma, avaliar criticamente a experiência e aquilo que foi a preparação académica para este momento final do curso. A análise SWOT apresentada em seguida visa a identificação das forças e fraquezas, bem como das oportunidades e ameaças com as quais

contactei na FLN. Relativamente aos pontos fortes e pontos fracos, estes são identificados através de uma avaliação interna e refletindo fatores intrínsecos, enquanto as oportunidades e as ameaças são possíveis de identificar tendo em conta uma avaliação externa, tendo por base fatores não diretamente sob controlo da instituição.

4.1 Pontos Fortes

4.1.1 Equipa Técnica - Integração e Acompanhamento

Na minha ótica, sem dúvida que o fator que contribuiu com maior intensidade para o sucesso do meu estágio em FC foi a equipa técnica e o seu acompanhamento contínuo. A relação estabelecida entre estagiário e toda a equipa reflete-se, inequivocamente, no sucesso do estágio curricular de um aluno finalista e comigo não foi diferente.

Desde o primeiro dia que me acolheram como parte da “casa” e se demonstraram disponíveis para ouvir, esclarecer dúvidas, elucidar conceitos e auxiliar no que fosse necessário. Os primeiros atendimentos são os mais atribulados ou, pelo menos, aqueles em que senti maior dificuldade por toda a responsabilidade associada ao ato de aconselhamento. Nestes momentos, a gentileza no esclarecimento das diversas questões que tive permitiu-me ir adquirindo autonomia e espírito crítico e fez com que, efetivamente, sentisse progresso a nível de todas as tarefas desempenhadas e segurança nas minhas ações e decisões. Talvez pelo facto de ter sido o único estagiário na FLN, foi possível ter a equipa inteiramente dedicada à minha aprendizagem, o que me tornou autónomo e permitiu consolidar conhecimentos teóricos adquiridos nas diversas unidades curriculares diretamente associadas à FC.

4.1.2 Atendimento diferenciado

Devido à proximidade que existe com a população, o aconselhamento farmacêutico tem em conta a situação específica de cada utente tornando-se o mais individualizado e diferenciado possível. Desde as situações mais rotineiras às mais peculiares, a interação estabelecida durante o atendimento tinha como objetivo recolher o máximo de informação essencial, sempre com uma perspetiva crítica sobre a mesma, de forma a estabelecer o melhor aconselhamento farmacológico e não farmacológico e identificar possíveis incongruências na medicação atual do utente. Esta complexidade na dispensa e interação com o utente foi um grande desafio, não só pela responsabilidade inerente ao ato farmacêutico, como pela confiança depositada no farmacêutico, por parte da população. A minha adaptação a esta tarefa foi feita de forma gradual ao longo dos meses, onde comecei por observar o atendimento realizado por parte dos colaboradores da FLN. Posteriormente, quando já detinha alguma

familiaridade com o processo e, tendo confiança nos meus conhecimentos teóricos, tornou-se a minha tarefa principal, sendo que o Dr. João Tiago Costa foi incansável no esclarecimento de dúvidas.

4.1.3 Diversidade de funções desempenhadas

As tarefas que desempenhei ao longo do estágio foram fulcrais para me adaptar mais rapidamente à dinâmica e ética de trabalho da FLN, uma vez que exerci as mais diversas funções desde a gestão de encomendas e organização e arrumação de produtos, atendimento ao público e aconselhamento de forma diferenciada, medição dos parâmetros bioquímicos (glicémia, colesterol total e pressão arterial), preparação de manipulados, gestão e controlo de stocks e validades dos produtos e, ainda, tive a oportunidade de assistir regularmente a formações *online*, bem como à conferência do receituário e posterior faturação dos organismos. Além do que foi anteriormente mencionado, a FLN detém de igual forma o serviço de administração de injetáveis e vacinas, passíveis de administração em FC. De referir, ainda, que pude participar no aviamento e organização da medicação dos utentes das Instituições Particulares de Solidariedade Social (IPSS) que colaboravam com a FLN.

Foi ao realizar estas novas tarefas de gestão de stocks e encomendas, a título de exemplo, que adquiri noções fundamentais, tais como os diferentes laboratórios e distribuidoras existentes, a circunstância dos medicamentos esgotados e rateados, os diferentes planos de comparticipação e a dualidade existente entre Preço de Venda ao Público (PVP) e Preço de Venda à Farmácia na gestão encomendas.

Desta forma, creio que o estágio me permitiu viver aquilo que é o dia-a-dia e o ritmo de trabalho de um farmacêutico numa farmácia comunitária, pelo que as diferentes funções que desempenhei foram fundamentais para a minha preparação enquanto futuro farmacêutico.

4.2 Pontos Fracos

4.2.1 Dificuldade na associação de nomes comerciais aos princípios ativos

Inicialmente, uma das maiores dificuldades que senti foi a associação de nomes comerciais de medicamentos aos respetivos princípios ativos. Ao longo do plano curricular do MICEF, lidamos essencialmente com princípios ativos o que, conjugado com o facto de a prescrição médica ser feita por Denominação Comum Internacional (DCI), constitui um enorme desafio no que diz respeito a relacionar e fazer corresponder o princípio ativo ao respetivo nome comercial. No entanto, com o decorrer do estágio foi algo que fui aprimorando e que acabou por não se manifestar num problema propriamente dito, visto que existiu uma familiarização

progressiva com as designações comerciais dos medicamentos ao exercer as diferentes tarefas além do atendimento.

Nesta fase, as tarefas de armazenamento e organização de medicamentos, por vezes desvalorizadas, foram essenciais para começar a desenvolver a capacidade de associar a marca ao respetivo grupo farmacológico e princípio ativo.

4.3 Oportunidades

4.3.1 Sifarma.MA[®]

A principal ferramenta de gestão e atendimento das FC é o conhecido Sifarma 2000[®], comercializado pela Glintt[®]. Apesar de ser utilizado por cerca de 90% das farmácias portuguesas, a Glintt[®] encontra-se a desenvolver um novo *software* mais completo, intuitivo e funcional - o Sifarma Módulo de Atendimento (Sifarma.MA[®]), de forma a fornecer uma solução cada vez mais focada no bom atendimento e aconselhamento do utente⁵.

No que me diz respeito, tive a oportunidade de trabalhar com ambos os *softwares*, uma vez que a FLN encontrava-se numa fase de transição do Sifarma 2000[®] para o Sifarma.MA[®]. Durante a fase inicial de aprendizagem e maturação de conhecimentos, o recurso mais utilizado foi, quase exclusivamente o *software* já familiar e rigorosamente dominado por todos os colaboradores. Após as diversas formações dadas pela Glintt[®] acerca do novo Sifarma, correção de problemas e disponibilização de novas ferramentas dentro do mesmo, foi no Sifarma.MA[®] que foram realizados a grande maioria dos atendimentos. A minha preferência, ainda que estivesse numa fase de construção, passou pelo novo Sifarma, pelas suas novas funcionalidades, aparência e por considerar que é muito mais intuitivo, atual e dinâmico.

No geral, considero que a evolução de *software* a que assistimos nas farmácias portuguesas é vantajosa e vai permitir o desenvolvimento de um serviço com cada vez mais qualidade e segurança. Além disso, creio que o facto de me ter familiarizado com ambos os *softwares* é uma mais-valia enquanto futuro farmacêutico a ingressar no mercado de trabalho.

4.3.2 Programa Valormed

A Valormed apresenta-se como uma sociedade sem fins lucrativos cuja responsabilidade é a recolha e gestão de resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora de uso através do SIGREM (Sistema Integrado de Gestão de Resíduos de Embalagens e Medicamentos)⁶. Penso que a preocupação com este tipo de temáticas é fulcral e, desta forma, foi com prazer que divulguei e promovi o projeto Valormed juntos dos utentes incentivando-os a reunir medicamentos fora do prazo de validade, cartonagens, *blisters* ou folhetos informativos para

que fossem depositados nos locais indicados à entrada da farmácia. Foi com agrado que, diariamente, verificava que existia uma adesão autónoma a este projeto por parte dos utentes.

4.3.3 Operação Luz Verde

O serviço “Operação Luz Verde” foi implementado no início da situação pandémica, sendo que o cerne deste projeto consiste na entrega de medicamentos hospitalares às farmácias comunitárias com intuito de evitar que os utentes se desloquem ao hospital para levantar a medicação. O sucesso do mesmo na FLN permitiu evitar deslocações desnecessárias, por parte dos utentes, de Miranda do Corvo a Coimbra, situação esta que os colocaria mais expostos a um possível contacto com o vírus SARS-CoV2 - sendo um ótimo mecanismo para diminuir o risco de infeção com COVID-19, especialmente junto de doentes mais fragilizados^{4,7}.

4.4 Ameaças

4.4.1 Pandemia COVID-19

Devido à situação que o país atravessava no momento em que iniciei esta fase do meu percurso académico, o estágio em FC perspectivava-se desafiante. Surgiram questões relativas ao facto de se a duração do mesmo seria ou não afetada, possíveis familiares ou colegas doentes, as máscaras, a desinfeção, entre outros. A maior ameaça não só ao estágio, como ao atendimento, foi a dificuldade na comunicação devido às barreiras físicas impostas para proteção individual dos profissionais e dos utentes da farmácia. No final, o que realmente importa é a saída de utentes da farmácia completamente esclarecidos sobre a sua terapêutica.

4.4.2 Medicamentos esgotados e rateados

Foi com alguma surpresa que me deparei, durante o decorrer do estágio, com um panorama de carência e escassez de determinados medicamentos. Desde então percebi que a problemática de escassez de medicamentos era uma situação generalizada e muito associada à progressiva degradação do preço dos medicamentos, quer sejam de marca ou genéricos, que torna difícil a missão de cumprir todo o circuito até ao doente. Este panorama fez com que muitos medicamentos ficassem **esgotados** ou, por outro lado, **rateados**, pelo que era feita uma racionalização dos mesmos pelos laboratórios de forma a que chegassem a todos os que deles necessitavam⁸.

Posso referir, a título de exemplo, o caso do **Ciprallex**[®] que contém a substância ativa escitalopram e apresenta indicação em perturbações de ansiedade, perturbações obsessivo-

compulsivas e episódios depressivos major⁹. Adicionalmente, também o **Valium**[®] se encontrava nesta situação. É um medicamento cuja substância ativa é o diazepam e está indicado no tratamento de sintomas e distúrbios associados à ansiedade, bem como de outras desordens psiquiátricas¹⁰.

Concluindo, este é um tópico que merece especial atenção, uma vez que constitui um entrave na relação com o utente e interfere naquilo que é a saúde e o bem-estar do utente.

4.4.3 Farmácia concorrente e locais de venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM)

No contexto da FLN, esta tem uma farmácia concorrente que se encontra numa posição mais favorável em termos de localização, uma vez que se encontra mais próxima do Centro de Saúde, o que constitui uma vantagem ao seu serviço e afeta negativamente a FLN.

Do mesmo modo, considero que os estabelecimentos de venda de MNSRM constituem uma ameaça não só à FC, como ao próprio farmacêutico, uma vez que desvalorizam aquilo que é o ato farmacêutico na dispensa do medicamento e promovem um uso irresponsável e irracional do mesmo. Ainda, estes locais de venda têm vindo a apresentar um crescimento exponencial e, aliando este fator ao facto de realizarem elevados volumes de encomendas, conseguem alcançar melhores margens e implementar os preços mais competitivos do mercado, o que acaba por atrair uma grande porção de utentes e, conseqüentemente, afetar as rentabilidades das farmácias de oficina.

Na minha opinião, terá que existir, cada vez mais, uma diferenciação da FC através do desenvolvimento de novos e mais inovadores serviços por parte do farmacêutico comunitário para, desta forma, evidenciar a genuína importância da profissão.

5. Casos Clínicos

Caso I

Uma utente jovem, de 28 anos, dirige-se à farmácia e refere que sente ardor a urinar. Mais pormenorizadamente, indiciou-me que sentia, por vezes, uma vontade repentina de urinar e um ligeiro ardor, pelo que, tinha receio que a situação evoluísse para uma infeção urinária, situação que era habitual e recorrente. Desta forma, terminou o discurso solicitando-me um antibiótico que já tinha tomado para a mesma situação.

Aconselhamento: Em primeiro lugar, recusei, imediatamente, a dispensa do antibiótico por ser um MSR. Após identificar a sintomatologia inicial de uma infeção urinária, propus-lhe que iniciasse o **RoterCysti**[®] 500mg que se apresenta como um medicamento tradicional à base

de plantas utilizado no tratamento sintomático de infeções do trato urinário e é constituído por um extrato seco de folha de uva-ursina¹¹ que demonstra efeito diurético, anti-inflamatório e antimicrobiano através da sua capacidade em alterar as características da superfície das células microbianas, o que diminui a capacidade destas bactérias em aderir às células uroepiteliais¹². Indiquei, ainda, que teria de tomar 2 comprimidos, duas vezes por dia, durante 5 dias consecutivos. Além disso, aconselhei que começasse a utilizar regularmente um gel de lavagem calmante como, por exemplo, o **Aveeno**[®] Hidratação Diária que é indicado para a higiene íntima diária e ajuda a manter o equilíbrio natural do pH¹³. Acrescentei que, visto que esta era uma situação recorrente, considerasse tomar o **Roter Cystiberry**[®] no futuro, produto que atua na prevenção das infeções urinárias devido à sua composição em arando vermelho que contém proantocianidinas que impedem a adesão, multiplicação e colonização da *Escherichia coli* no epitélio da bexiga¹⁴. Todavia, informei a utente previamente que devia ser consultada por um médico face à recorrência destes eventos. Por fim, acabei por aconselhar algumas medidas não farmacológicas como, por exemplo, a ingestão abundante de água, evitar a retenção de urina, utilizar vestuário adequado e roupa interior de algodão e frisei a importância de conjugar os produtos com as medidas não farmacológicas para que houvesse um aumento da eficácia do tratamento e a prevenção de futuras infeções.

Caso 2

Um senhor, de 32 anos, dirige-se à farmácia e refere que está com obstipação e precisa, urgentemente, de uma solução para este problema que está a começar a influenciar o seu dia-a-dia e a tornar-se numa situação recorrente. Além disso, frisa que quer algo que atue rapidamente.

Aconselhamento: Inicialmente, questioneei o utente se tinha mais algum sintoma associado, há quanto tempo vivia este tipo de episódios, bem como se tinha tomado alguma medicação para este problema no passado ou se tinha alguma doença associada. Prontamente me respondeu que apenas sentia um aumento do volume abdominal, que este episódio já durava há uma semana mas que tem vindo a ser recorrente, acrescentando que não tinha qualquer outro problema, nem tomava qualquer tipo de medicação. Desta forma, comecei por aconselhar **Dulcolax**[®] para tratar a obstipação atual e causar o alívio rápido. O seu mecanismo consiste no aumento da secreção de água e eletrólitos pela mucosa e na estimulação dos neurónios sensoriais entéricos que induzem o peristaltismo intestinal¹⁵. Por conseguinte, é um medicamento com ação imediata e que requer uma utilização cuidada pois provoca habituação e, como tal, não pode ter um uso continuado pois, caso contrário, poderia provocar

hipocaliemia e desequilíbrio eletrolítico. O seu princípio ativo é o Bisacodilo, um laxante de ação local cujo mecanismo resulta na estimulação da defecação, amolecimento das fezes e redução do tempo de trânsito¹⁶. Em segundo lugar, tendo em conta que é uma situação recorrente, aconselhei **Laevolac**[®] que desempenha um papel a longo prazo e, assim sendo, não tem ação imediata nem provoca habituação. O seu principal constituinte é a lactulose cuja ação se deve às suas propriedades osmóticas que produzem um aumento da pressão osmótica no lúmen intestinal e, deste modo, favorecem a retenção de água e aumento do fluido fecal que induz o amolecimento das fezes^{15,17,18}. De seguida, comecei por explicar o esquema terapêutico que ia envolver estes dois produtos que passava por começar os dois ao mesmo tempo, tomando-os intercaladamente para, quando a obstipação atual estiver resolvida, retirar o **Dulcolax**[®] e manter apenas o **Laevolac**[®] que já estará a fazer o seu efeito, uma vez que apresenta um período de latência de 2 a 3 dias. Finalmente, realcei a importância das medidas não farmacológicas como a ingestão de maior quantidade de líquidos, prática de atividade física, realização de uma dieta rica em fibras e promoção da reeducação do intestino.

Caso 3

Utente do sexo masculino, com cerca de 40 anos, dirige-se à farmácia solicitando algo para uma infeção na pele localizada nos espaços interdigitais do pé, situação que é bastante recorrente. Refere, pormenorizando, que a pele se encontra esbranquiçada, a descamar, com algum prurido. Além disso, menciona uma sensação de ardor no pé.

Aconselhamento: Inicialmente, passei a explicar ao utente que o seu problema seria Pé de Atleta, ou seja, uma infeção fúngica muito comum nos pés e que exigia um tratamento rigoroso pois é algo muito contagioso que se transmite facilmente, quer por transmissão indireta através de objetos contaminados, quer por transmissão direta pelo contacto pele com pele, pelo que, podia perfeitamente propagar-se pelo resto do seu corpo e provocar outras infeções fúngicas. Antes de qualquer aconselhamento, expliquei que estes tipos de infeções aparecem decorrentes de fatores como o calor e a humidade, isto é, tanto a transpiração como a oclusão da pele do pé podem desencadear este tipo de infeções pois impedem a dispersão de calor e propiciam a humidade. Desta forma, indiquei algumas medidas não farmacológicas a adotar no futuro como, por exemplo, secar bem os pés e os espaços interdigitais após o banho, utilizar uma toalha exclusivamente para o local da infeção, evitar andar descalço em balneários ou piscinas, usar meias de algodão e mudá-las se sentir calor ou depois de realizar desporto, deixar os pés respirar em casa, bem como o calçado, e lavar frequentemente as toalhas e não partilhar as mesmas¹⁹. Quanto ao seu tratamento, comecei por aconselhar o **Canesten**[®]

creme que é um antifúngico cuja substância ativa é o clotrimazol que atua contra os fungos através da inibição da síntese do ergosterol, o que leva a danos estruturais e funcionais na membrana plasmática dos mesmos. Referi que este tratamento deve ser feito entre 3 a 4 semanas com 2 a 3 aplicações diárias e sublinhei que, para que a infeção seja efetivamente tratada, o tratamento deve ser realizado até ao fim, mesmo que verifique melhorias no decorrer desse período. Ainda, informei o utente que, caso não houvesse melhoria após as 4 semanas de tratamento, devesse contactar imediatamente o médico²⁰. Adicionalmente, sugeri o **Canesten**[®] pó como adjuvante ao tratamento com o creme e que deve ser aplicado diariamente nos sapatos e meias com o objetivo de absorver a humidade e impedir reinfeção. Tal como o creme, deve ser usado durante 3 a 4 semanas²¹. Por fim, sugeri a utilização de **Cicalfate** loção da Avène após o banho e antes da aplicação do creme supramencionado. Este é um produto com ação secante, reparadora e calmante devido à sua composição com agentes antibacterianos²².

6. Conclusão

Em reflexão acerca do que foi supracitado, torna-se evidente o quão importante é ter a unidade Estágio Curricular no plano de estudos de MICE. A experiência vivenciada durante este período torna-se imprescindível para a preparação do estudante para o mercado de trabalho e para o seu sucesso profissional enquanto futuro farmacêutico. A exposição ao contexto real e o contacto diário com o utente evidenciam a importância que o farmacêutico tem na sociedade e a confiança que é depositada na farmácia, pelos utentes, para a satisfação das suas necessidades. Desta forma, considero que o estágio se apresenta como um instrumento imprescindível na formação prática de qualquer estudante e, não só pelo leque de competências pessoais e profissionais que permite adquirir e desenvolver, mas também por possibilitar a aplicação de conhecimentos teóricos adquiridos ao longo de todo o percurso académico, permitindo a estruturação de uma atitude deontológica aliada ao rigor científico exigido no exercer da profissão.

Ao nível das competências desenvolvidas, senti uma notória evolução ao nível da capacidade de comunicação e adaptação de discurso face às diferentes ocasiões, autonomia, postura e capacidade de trabalhar sob pressão. Por outro lado, a nível pessoal, sinto que realcei confiança nas minhas capacidades, empatia e sensibilidade. É indubitável que, além de um profissional do medicamento, o farmacêutico é um agente de saúde pública e deve estar em constante renovação de conhecimento técnico e científico, com o intuito permanente de promover o bem-estar e saúde do utente.

Referências Bibliográficas

1. Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia - Diretiva 2013/55/EU de 20 de novembro de 2013. Jornal Oficial da União Europeia. 354 (2013) 132-170.
2. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - A Farmácia Comunitária [Consult. 14 fev. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
3. VALORMED - **Farmácia Comunitária e LVMNSRM**. [Consult. 14 fev. 2021]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/13/spanfarmaciaspan-comunitaria>
4. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Operação Luz Verde**. 2020. [Consult. 14 fev. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/operacao-luz-verde-chegou-a-mais-de-oito-mil-doentes/>
5. GLINTT - **SIFARMA**. [Consult. 6 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
6. VALORMED - **Quem somos** [Consult. 6 abr. 2021]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
7. FERNANDES, IRINA - **Dispensa de medicamentos hospitalares nas farmácias premiada**. Revista Saúde. 2020. [Consult. 7 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.revistasauda.pt/noticias/Pages/Projecto-de-dispensa-de-medicamentos-hospitalares-nas-farmacias-premiado.aspx>
8. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Farmácias preocupadas com escassez de medicamentos**. Notícias. 2019. [Consult. 7 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/farmacias-preocupadas-com-escassez-de-medicamentos/>
9. INFARMED - Cipralex® comprimido revestido por película: Resumo das Características do Medicamento. 2020. [Consult. 7 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
10. INFARMED - Valium® comprimido: Resumo das Características do Medicamento. 2014. [Consult. 7 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
11. INFARMED - RoterCysti® 500 mg comprimido revestido por película: Resumo das Características do Medicamento. 2016.[Consult. 8 abr. 2021]. Disponível na Internet:

<https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

12. HEAD, KATHLEEN A. - **Natural Approaches to Prevention and Treatment of Infections of the Lower Urinary Tract**. Vol 13:3 (2008) 227-244.

13. AVEENO® - *Daily Moisturising Gel Íntimo*. 2020. [Consult. 8 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.aveeno.pt/produtos-corporais/gel-intimo#indicado-para>

14. LUCZAK, TIANA; SWANOSKI, MICHAEL - **A review of cranberry use for preventing urinary tract infections in older adults**. *The Consultant Pharmacist*. Vol. 33:8 (2018) 450-453.

15. MENDES, ANA PAULA - **Aconselhamento farmacêutico na obstipação em adultos**. Ficha técnica do Centro de Informação do Medicamento. 2013. [Consult. 8 abr. 2021]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/ft107_aconselhamento_farmacutico_na_obstipacao_12561500135b042e73679a5.pdf

16. INFARMED - Dulcolax® 5 mg comprimido revestido: Resumo das Características do Medicamento. 2014. [Consult. 8 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

17. FORD, ALEXANDER C.; TALLEY, NICHOLAS J. - **Laxatives for chronic constipation in adults**. *British Medical Journal* 345 (2012).

18. INFARMED - Laevolac® xarope: Resumo das Características do Medicamento. 2013. [Consult. 8 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

19. MÉDIS - **Pé de atleta: que tipo de infeção é e o que fazer para a prevenir**. 2018. [Consult. 9 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.medis.pt/mais-medis/saude-e-medicina/pe-de-atleta-o-que-e-e-como-prevenir/>

20. INFARMED - Canesten® creme: Resumo das Características do Medicamento. 2014. [Consult. 9 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

21. INFARMED - Canesten® pó cutâneo: Resumo das Características do Medicamento. 2014. [Consult. 10 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

22. AVÈNE - Cicalfate Loção secante reparadora. 2021. [Consult. 10 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.eau-thermale-avene.pt/rosto/cuidados-especificos/pele-irritada/cicalfate-locao-secante-reparadora>

Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

The logo for Abbvie, featuring the word "abbvie" in a lowercase, dark blue, sans-serif font. The letters are closely spaced and have a modern, clean appearance.

Estágio orientado pela Dra. Sara Farinha

Lista de Abreviaturas

AIM:	Autorização de Introdução no Mercado
CATS:	Comissão de Avaliação de Tecnologias de Saúde
CE:	Comissão Europeia
CFT:	Comissão de Farmácia e Terapêutica
CHMP:	Comité dos Medicamentos de Uso Humano
DATS:	Direção de Avaliação de Tecnologias de Saúde
DMARDs:	Fármacos Antirreumáticos Modificadores da Doença
EMA:	Agência Europeia do Medicamento
EUA:	Estados Unidos da América
JAK:	Janus Associated Kinase
PICO:	População, Intervenção, Comparadores e <i>Outcomes</i>
SIATS:	Sistema de Informação para a Avaliação das Tecnologias de Saúde
SiNATS:	Sistema Nacional de Avaliação de Tecnologias de Saúde
SNS:	Serviço Nacional de Saúde
SWOT:	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>

I. Introdução

No âmbito da unidade Estágio Curricular, inserida no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, tive a oportunidade de realizar estágio na área de Indústria Farmacêutica na AbbVie, entre 3 de maio e 30 julho de 2021, sob a orientação da Dra. Sara Farinha.

Considerando aquilo que é a profissão farmacêutica e a diversidade de funções que o farmacêutico pode desempenhar, a possibilidade de experienciar estágios além da farmácia comunitária mostra-se preponderante no sentido de capacitar e preparar os estudantes para os diferentes desafios que irão enfrentar no mercado de trabalho. Neste caso, considero que a opção de vivenciar esta vertente da Indústria Farmacêutica se apresenta como uma mais valia enquanto futuro farmacêutico, não só pelas diversas capacidades que poderia aprimorar e exponenciar, como pelo facto de ser um setor com uma abordagem mais superficial ao longo do curso. Desta forma, julgo que a realização de uma experiência curricular neste contexto é de extrema relevância, uma vez que permite tornar a minha formação o mais robusta e completa possível.

Atendendo à importância desta oportunidade, propus-me a estagiar na AbbVie, uma companhia biofarmacêutica voltada para a inovação e centrada no doente. Nesta sequência, foi-me dada a possibilidade de integrar a equipa de *Market Access*, enquadrada no departamento de *External Affairs & Market Access* cuja missão final é garantir a disponibilização dos produtos desenvolvidos pela AbbVie ao doente.

O presente relatório de estágio apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) que surge como uma apreciação crítica de todo este desafio através da delimitação dos pontos fortes e fracos, bem como das oportunidades e ameaças, o que permitirá realizar uma avaliação interna e externa, respetivamente.

2. AbbVie

A AbbVie é uma empresa biofarmacêutica com foco no desenvolvimento de um fluxo consistente de novos medicamentos inovadores com vista a proporcionar um impacto notável na vida das pessoas, nas sociedades, e no avanço da própria ciência. Do mesmo modo, melhorar o acesso aos medicamentos comercializados pela AbbVie, tal como inovar para dar resposta aos maiores e mais difíceis desafios científicos e médicos, mostram-se também como os principais objetivos desta farmacêutica.¹

Embora a AbbVie apenas tenha sido lançada recentemente, apresenta uma história de crescimento mais profunda com origem numa empresa farmacêutica líder, a Abbott, fundada em 1888. Posto isto, em janeiro de 2013, a AbbVie foi fundada como uma empresa biofarmacêutica independente da Abbott, com a qual continua a partilhar uma história em comum e fortes perspetivas de futuro. A partir deste momento, verificou-se uma evolução notável com a aprovação do primeiro medicamento criado pela AbbVie direcionado para a especialidade de virologia em 2014 e a disponibilização, em Portugal, do mais recente tratamento da AbbVie para a hepatite C, em 2018. No ano seguinte, em 2019, assistiu-se em Portugal à disponibilização de três novos tratamentos que abrangem as seguintes patologias: psoríase, doença de Parkinson e leucemia linfocítica crónica. Mais recentemente, no ano de 2020, além da disponibilização em Portugal do último tratamento desenvolvido para a artrite reumatóide, verificou-se a aquisição da Allergan, o que permitiu englobar diversas áreas terapêuticas novas e uma extensão e diversificação do portefólio da empresa.²

Desta forma, além do alcance adicional que resultou da integração da Medicina Estética no leque de soluções terapêuticas da AbbVie, as restantes áreas da saúde com intervenção da biofarmacêutica são: a Imunologia, Oncologia, Neurociências, Virologia e Oftalmologia. Devido à intervenção predominante nestas seis áreas terapêuticas, a AbbVie garante o acesso dos doentes aos seus produtos em mais de 175 países, o que permite que mais de 50 milhões de doentes possam ser tratados todos os anos com os diferentes medicamentos desenvolvidos.¹

3. Departamento de *External Affairs & Market Access*

O Acesso ao mercado (“*Market Access*”) consiste no processo que determinada Indústria Farmacêutica percorre para que as suas tecnologias e produtos se tornem disponíveis em determinada comunidade ou região. Atualmente, o acesso ao mercado e a negociação de preços e de decisões de reembolso têm-se revelado no mais importante desafio de cada empresa, sendo um momento decisivo na vida de um novo medicamento.

A existência de um Estado cada vez mais normativo e que, em função do crescimento da despesa com medicamentos, passou a exigir uma demonstração cabal do valor terapêutico de um fármaco e do seu valor económico, relativamente às alternativas existentes, fez com que a Indústria Farmacêutica se visse obrigada a robustecer esta área, surgindo, assim, o *Market Access*.

Sendo parte integrante de todo o ciclo de vida do medicamento, o *Market Access* surge com uma relevância acrescida mediante todas as barreiras existentes na introdução de novos

medicamentos no mercado, nomeadamente, a crescente necessidade de avaliar a vertente farmacoeconómica intimamente ligada à proposição de valor do produto.

3.1 SiNATS

Desta forma, em Portugal, o Ministério da Saúde sentiu necessidade de criar um Sistema Nacional de Avaliação de Tecnologias de Saúde (SiNATS), estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 97/2015, para alterar o paradigma no modo de utilização e aquisição de tecnologias de saúde. Além de introduzir racionalidade na comparticipação e aquisição das tecnologias de saúde, são objetivos do SiNATS a maximização dos ganhos em saúde e da qualidade de vida dos cidadãos, a contribuição para a sustentabilidade do Serviço Nacional de Saúde (SNS), a certificação da utilização eficiente dos recursos públicos em saúde, a monitorização da utilização e a efetividade das tecnologias, a redução dos desperdícios e ineficiências, bem como a promoção do acesso equitativo às tecnologias e do desenvolvimento de inovação importante. Adicionalmente, o SiNATS encontra-se suportado por um Sistema de Informação para a Avaliação das Tecnologias de Saúde (SIATS), que contém a informação relevante para a avaliação das tecnologias de saúde, cuja responsabilidade diz respeito ao INFARMED.

O SiNATS marca o aparecimento de um novo paradigma marcado por inovações importantes que evidenciam o carácter compreensivo do sistema, uma vez que marca a intenção de abranger os dispositivos médicos e os procedimentos médicos e cirúrgicos no processo de avaliação de tecnologias de saúde e, simultaneamente, prevê que o valor das tecnologias deve ser apurado ao longo de todo o seu ciclo de vida e não apenas no momento de introdução no mercado, isto é, todo o processo de avaliação e monitorização inclui o momento prévio (*ex-ante*) e posterior (*ex-post*) à entrada no mercado. Em suma, o SiNATS regula, a nível nacional, a matéria referente ao regime de preços e de comparticipação.

Concluindo, o SiNATS acaba por funcionar como o mecanismo de validação da informação e da aplicação das diferentes tecnologias de saúde, o que, conseqüentemente, irá introduzir racionalidade a todas as decisões de comparticipação e aquisição de tecnologias de saúde³.

3.2 Avaliação de Tecnologias de Saúde em Portugal

Inicialmente, quando referimos o termo Avaliação de Tecnologias de Saúde (ATS), consideramos a avaliação técnica (regulamentar), a avaliação terapêutica e, por fim, a avaliação económica³. O principal objetivo da ATS é apoiar a decisão de utilização e financiamento das

tecnologias de saúde, com base em critérios específicos como a segurança, a qualidade, a eficácia, a eficiência, a efetividade e, ainda, a eficácia comparativa⁴.

Em Portugal, podemos dividir o processo de financiamento em quatro etapas. Após o pedido de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) ser feito à Agência Europeia do Medicamento (EMA), este vai ser avaliado pelo Comité dos Medicamentos de Uso Humano (CHMP) e, posteriormente, revalidado pela Comissão Europeia (CE)⁵. Durante este período de aprovação da AIM, avalia-se a qualidade, a segurança e eficácia do medicamento. Entretanto, após parecer positivo pelo CHMP, o requerente deve submeter um pedido de comparticipação ou avaliação prévia ao INFARMED, através do “Formulário para pedido de definição de proposta inicial de avaliação (PICO) após parecer positivo CHMP (pré-AIM)”. Após deliberação do INFARMED, o titular da AIM fica com as condições de avaliação (PICO) - População, Intervenção, Comparadores e *Outcomes* - definidas, o que lhe permite iniciar o processo interno de forma agilizada⁶. De seguida, numa segunda fase, procede-se à elaboração e submissão do *dossier* farmacoterapêutico. Em caso de avaliação positiva pela Comissão de Avaliação de Tecnologias de Saúde (CATS), em articulação com a Direção de Avaliação de Tecnologias de Saúde (DATS)⁷, o titular da AIM pode avançar para a elaboração e submissão da avaliação económica. Por fim, o último passo inclui a negociação e o estabelecimento do contrato em que são definidos parâmetros de extrema importância como o preço e um limite máximo de encargos ou outras restrições de uso.

No que diz respeito à avaliação farmacoterapêutica e económica, podemos ter três diferentes desfechos consoante o rumo da resposta do INFARMED. Numa primeira hipótese, caso a avaliação farmacoterapêutica tenha uma opinião negativa, teremos, inevitavelmente, uma decisão negativa no processo. Por outro lado, caso seja demonstrada equivalência terapêutica, isto é, não há demonstração de valor terapêutico acrescentado, o titular da AIM terá de assumir a via de minimização de custos e demonstrar vantagem económica versus o medicamento comparador. A terceira via possível neste processo é a via da demonstração de valor terapêutico acrescentado em que o titular da AIM pode pedir um preço superior face ao seu comparador, o que, impreterivelmente, acresce complexidade ao processo e exige a submissão de uma análise de custo-efetividade.

Por conseguinte, as conclusões obtidas a partir da avaliação de tecnologias de saúde permitirão estabelecer decisões como: revogar, deferir ou indeferir a sua utilização no SNS; decidir o preço, a comparticipação, bem como a aquisição ou instalação da nova tecnologia de saúde; e, ainda, emitir recomendações ou decisões sobre a utilização das tecnologias em questão. Neste sentido, são estabelecidos contratos com o INFARMED com o objetivo final

de garantir o funcionamento eficiente do sistema de saúde, tendo sempre em consideração a comportabilidade financeira para o SNS³.

3.3 Contratos

O Estado português é responsável pelo financiamento dos medicamentos das várias empresas mediante diferente tipo de contratos. Pormenorizando, os contratos podem ser de comparticipação ou de avaliação prévia, sendo ambos processos de avaliação cujo objetivo é obter o apoio do Estado na aquisição de medicamentos. Mais concretamente, no que concerne à avaliação da **comparticipação**, esta reflete-se através do apoio que o Estado disponibiliza ao utente na aquisição de medicamentos no seu dia-a-dia nas farmácias. Na **avaliação prévia hospitalar** avalia-se a possibilidade ou não do financiamento e utilização de medicamentos pelos hospitais do SNS, determinando as condições de utilização destes⁸. É com base no deferimento destas avaliações que são concretizados os contratos entre o titular da AIM, ou um representante legal, e o INFARMED. Todas as decisões são tornadas públicas através do INFARMED, seja o processo deferido, seja indeferido³.

Em caso de avaliação prévia positiva, o contrato é celebrado e ficam definidos os detalhes do financiamento do medicamento. De seguida, assiste-se à decisão da adoção do medicamento a nível hospitalar por parte da Comissão de Farmácia e Terapêutica (CFT) dos diversos hospitais⁹.

4. Análise SWOT

Doravante, analisarei de forma crítica os aspetos que considero mais relevantes e oportunos decorrentes do meu estágio curricular. Por conseguinte, irei recorrer a uma análise SWOT que me permitirá fazer uma apreciação de toda a experiência, tanto a nível individual enquanto estagiário, como enquanto colaborador de uma empresa multinacional como a AbbVie.

4.1 Pontos Fortes

4.1.1 Equipa de *Market Access* - AbbVie Way

Desde o primeiro contacto com a AbbVie até ao momento em que integrei a equipa de *Market Access* dirigida pela Dra. Sara Farinha, percebi que integrara uma estrutura com uma cultura bem definida a nível interdepartamental. De facto, a AbbVie, além de se comprometer em atingir os melhores resultados em saúde e dar resposta a necessidades terapêuticas não correspondidas, prima de igual forma pelo bem-estar dos seus colaboradores. Desde a

primeira reunião que tive com a Dra. Sara Farinha, percebi que estava no sítio certo. A amabilidade, a boa disposição e a dedicação que vivenciei e observei, tanto por parte da equipa como dos restantes departamentos, foram seriamente das maiores surpresas deste meu percurso. A toda a equipa, estou extremamente grato por toda esta experiência que teve tanto de boa, como de enriquecedora.

4.1.2 Inductions

Como forma de integrar os novos membros na equipa da AbbVie, é prática a realização de *Inductions* - que consistem em reuniões demonstrativas por parte de todos os departamentos da empresa - com o intuito de dar a conhecer as diferentes áreas de intervenção, as principais atividades de cada departamento (isto é, o seu *modus operandi*), bem como os respetivos membros. Consequentemente, tive a oportunidade de conhecer um pouco mais sobre departamentos como o departamento de Farmacovigilância, Qualidade, Assuntos Regulamentares, Assuntos Médicos, Investigação e Desenvolvimento, entre outros. Considero que estas *Inductions* foram de extrema importância para o meu envolvimento na empresa, uma vez que me permitiram interagir com muitos dos colaboradores e com todos os departamentos.

4.1.3 Diversidade de funções

Após a integração na equipa de *Market Access*, seguiram-se vários momentos de formação, os quais foram essenciais para ganhar autonomia nas diferentes funções que viria a exercer. Embora tivesse um apoio constante da Dra. Sara Farinha, assumi diversas responsabilidades nestes três meses como, por exemplo: elaboração de um *abstract* e *poster* relativos a um dos produtos da Abbvie indicado na oncologia (Venclyxto), participação em projetos *Cross* ao nível da atualização de uma base de dados interna e elaboração da *newsletter* da equipa de *Market Access* com as novidades mais relevantes da área e do mercado, envolvimento em equipas específicas responsáveis pelo desenvolvimento do planeamento estratégico de novos produtos ou novas indicações terapêuticas, participação na redação de um *dossier* de valor, bem como de uma proposta económica e, por fim, preparação de documentação para submissão na plataforma SiNATS. Em suma, foi-me permitido participar em várias etapas do processo de financiamento de um produto, desde o cálculo de preços de medicamentos, até à sua avaliação farmacoterapêutica e farmacoeconómica.

Deste modo, estar envolvido na gestão parcial do processo de um dos principais produtos da AbbVie (Rinvoq[®]), assim como participar na realização de diversos estudos e projetos *Cross*

permitiu-me conhecer muito do espectro processual necessário para que um medicamento seja aprovado em Portugal.

4.2 Pontos Fracos

4.2.1 Teletrabalho

Tendo em consideração o período pandémico que vivemos, todo o período de estágio ficou restringido ao teletrabalho. Embora as reuniões de equipa fossem num formato presencial na empresa, o estágio foi predominantemente *online*, o que, inevitavelmente, retira muito daquilo que é a experiência e a convivência diária dos colaboradores em que prevalecem as interações entre equipa e entre departamentos, que enfatizam a dinâmica do mundo real de trabalho.

Todavia, independentemente do regime do estágio, sempre me senti integrado devido ao notável esforço e à dedicação exercida por todos os colaboradores com os quais tive a oportunidade de contactar nas diferentes funções que exerci.

4.2.2 Formação em *Market Access* e Farmacoeconomia

Embora o plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas seja riquíssimo e bastante versátil, considero que seria benéfica uma abordagem a novas temáticas com crescente importância no ramo da Indústria Farmacêutica, como é o exemplo da farmacoeconomia e, inequivocamente, o *Market Access*. Uma vez que, sendo a Indústria Farmacêutica uma opção viável após a conclusão do curso, um aprofundamento neste segmento da formação seria uma mais-valia para qualquer futuro farmacêutico que ambiciona ingressar no setor empresarial.

4.3 Oportunidades

4.3.1 *Abbvie Global meetings*

Enquanto organização global, a *AbbVie* encontra-se presente em mais de 70 países e organizada em 5 regiões diferentes, nomeadamente: Estados Unidos da América (EUA); América Latina; Europa Ocidental e Canadá; Europa de Leste, Médio Oriente e África; Japão, Ásia e Pacífico. Contudo, é nos EUA que podemos encontrar a sede central da Biofarmacêutica, mais precisamente, em *North Chicago, Illinois*. Neste sentido, acaba por estar implícito o contacto entre a *AbbVie Portugal* com a equipa da *Global* responsável pela região da Europa Ocidental e Canadá. Naturalmente, o departamento de *Market Access* é um dos que

acaba por ter maior contacto além fronteiras, quer ao nível de definição de estratégias, quer ao nível de discussão de ideias e partilha de informações clínicas.

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de assistir e participar em várias *Global meetings* relativas a um dos principais produtos da Abbvie, o Rinvoq[®], com indicação na Espondilite Anquilosante. Considero que a integração neste projeto e em todas as suas etapas me permitiu contactar com uma nova realidade que me cativou bastante e que contribuiu para uma aprendizagem ainda mais rica e profissional.

4.3.2 Produto Rinvoq[®]

Em primeiro lugar, o Rinvoq[®] é um inibidor da *Janus Associated Kinase* (JAK) aprovado, até ao momento, no tratamento da artrite reumatóide ativa moderada a grave em doentes adultos que tiveram uma resposta inadequada a um ou mais fármacos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs). Todavia, a AbbVie encontra-se a desenvolver o processo de submissão do Rinvoq[®] em diferentes indicações terapêuticas como, por exemplo, a Artrite Psoriática, a Espondilite Anquilosante e a Dermatite Atópica.

Neste sentido, no decorrer do meu estágio curricular, tive a oportunidade de fazer parte da *brand team* da área de reumatologia envolvida no processo do Rinvoq[®] na Artrite Psoriática, bem como na Espondilite Anquilosante. Adicionalmente, estive envolvido em funções pontuais do processo na Dermatite Atópica que também se encontrara em desenvolvimento.

Considerarei estes projetos uma incrível oportunidade, uma vez que pude estar envolvido num ambiente propício à aquisição exponencial de experiência e conhecimentos, enquanto contactava com profissionais de excelência com bastante experiência no setor e me aproximava daquilo que é o exercício profissional no segmento de *Market Access*.

4.4 Ameaças

4.4.1 Competitividade no mercado de trabalho

Embora não tenha sido algo sentido ao longo da minha experiência na AbbVie, muito pelo contrário, é de conhecimento comum que, atualmente, cada vez se verifica uma maior competitividade no setor da Indústria Farmacêutica em que urge a procura de diferenciação.

No que diz respeito ao *Market Access*, área que pretendo explorar após a conclusão do Mestrado, temo que seja difícil envergar neste ramo pelo conhecimento e experiência que são exigidos, o que se poderá tornar numa ameaça para recém-Mestres. Face a este panorama, focar-me-ei sempre em melhorar os meus aspetos menos positivos, continuar a estudar e

adquirir conhecimento de forma a estar sempre em progressão e sob domínio de novas capacidades.

5. Conclusão

A realização de estágios curriculares é, definitivamente, uma ferramenta indispensável para a preparação dos estudantes para aquele que será o seu futuro profissional. No meu caso, ter a oportunidade de integrar uma empresa multinacional como a AbbVie permitiu-me desenvolver conhecimentos únicos e aprimorar competências que são, cada vez mais, necessárias no mundo profissional e serão, certamente, uma mais valia para a minha entrada no mercado de trabalho.

Embora a experiência tenha apenas durado 3 meses, considero que foi a etapa mais enriquecedora e desafiante de todo o meu percurso académico, como também aquela que me possibilitou crescer mais. Além de me ter possibilitado expandir a minha visão daquilo que é a Indústria Farmacêutica, foi um período bastante intenso que me permitiu aprender muito em pouco tempo. Ainda que tenha sido o meu primeiro contacto com a área de *Market Access*, toda a envolvente farmacoterapêutica e económica fascinam-me e levam-me a querer aprofundar todo o conhecimento teórico e prático que adquiri neste estágio, o que me levará, certamente, a explorar este setor no meu futuro. Neste sentido, este percurso foi essencial para aquilo que são os meus objetivos doravante.

Com a sensação que vivenciei uma oportunidade como há poucas, exalto o privilégio que foi contactar diariamente com todos os profissionais dos diferentes departamentos, o que me concedeu a oportunidade de melhorar inúmeras capacidades que se mostram imprescindíveis nos dias atuais: o trabalho em equipa, a gestão de tempo e problemas, o espírito crítico, a capacidade de comunicação e a flexibilidade. Ainda, associado ao facto de este ser o segundo contacto que estabeleço com a Indústria Farmacêutica, estimo que acabo esta etapa com um maior *know-how* sobre aquilo que é integrar uma empresa, um maior desenvolvimento das minhas *soft* e *hard skills* e com competências e valores de excelência que, de outra forma, não conseguiria obter.

Por fim, não posso deixar de agradecer à incrível equipa de *Market Access* com quem tive o prazer de contactar - Sara Farinha, Inês Ramos e Carolina Galvão -, bem como a todos os profissionais que fazem parte da AbbVie pela constante disponibilidade e carinho em todos os momentos. Sinto-me extremamente agradecido e honrado pelo voto de confiança que acabou por me elucidar quanto à direção que quero seguir no meu futuro. Resta-me continuar a dar o melhor de mim e lutar pelos objetivos que quero alcançar.

Referências Bibliográficas

1. ABBVIE - Investigação e Desenvolvimento Farmacêutico. 2021. [Consult. 8 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.abbvie.pt/>
2. ABBVIE - *A History of Impact*. 2021. [Consult. 8 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.abbvie.com/landing/a-history-of-impact.html>
3. Decreto-Lei n.º 97/2015 de 1 de junho. Diário Da República n.º 105/2015, Série I de 2015-06-01.
4. INFARMED - Avaliação de tecnologias de saúde. 2016. [Consult. 8 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/avaliacao-tecnologias-de-saude>
5. INFARMED - Procedimentos de AIM. 2016. [Consult. 8 ago. 2021]. Disponível na Internet: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/procedimentos_de_aim
6. Circular Informativa n.º 064/CD/100.20.200 de 27 de março de 2019. INFARMED. 2019.
7. INFARMED - Comissão de Avaliação de Tecnologias de Saúde. 2016. [Consult. 8 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/comissoes-tecnicas-especializadas/comissao-de-avaliacao-de-tecnologias-de-saude>
8. INFARMED - Participação/Avaliação prévia hospitalar. 2016. [Consult. 8 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/avaliacao-tecnologias-saude/avaliacao-terapeutica-economica/comparticipacao/-avaliacao-previa-hospitalar>
9. ALVES, C.; MENDES, D.; MARQUES, F. B. - O papel da avaliação económica na seleção dos medicamentos. Boletim do Centro de Informação do Medicamento, Boletim Janeiro-Março (2019).

Parte III

Monografia

“Células alogénicas CAR-T *“Off-the-shelf”* como meio para criar um banco de células CAR-T universal: um desafio para o futuro”

Monografia orientada pelo Professor Dr. João Nuno Moreira

Lista de Abreviaturas

BCMA:	Antigénio de Maturação de Células B
BEP:	Bloqueadores da Expressão de Proteínas
B-LLA:	Leucemia Linfoblástica Aguda das células B
CAA:	Células Apresentadoras de Antigénios
CAR:	Recetor Quimérico Antigénico
CMSP:	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CMV:	Citomegalovírus
DLBCL:	Linfoma Difuso de Grandes células B
EBV:	Vírus <i>Epstein-Barr</i>
EUA:	Estados Unidos da América
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FNT:	Fator de Necrose Tumoral
GVHD:	Doença <i>Graft-Versus-Host</i>
HDR:	<i>Homology-Directed Repair</i>
HLA:	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
LLC:	Leucemia Linfocítica Crónica
MHC:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIT:	Molécula Inibitória do TCR
MM:	Mieloma Múltiplo
NDZ:	Nucleases de Dedo de Zinco
NHEJ:	<i>Non-Homologous End Joining</i>
PBMC:	Células Sanguíneas Mononucleares Periféricas
scFv:	Fragmento Variável de Cadeia Simples
SCU:	Sangue do Cordão Umbilical
SLC:	Síndrome de Libertação de Citocinas
TALE:	<i>Transcription Activator-Like Effector</i>
TALEN:	<i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease</i>
TCE:	Transplante de Células Estaminais
TCR:	Recetor de Células T
TRAC:	Cadeia Constante α do TCR
TRBC:	Cadeia Constante β do TCR
UCART:	Células CAR-T Universais
VST:	Células T Vírus-específicas

Resumo

A terapêutica CAR-T revela-se, cada vez mais, como a imunoterapia emergente mais efetiva no tratamento do cancro. Embora tenha demonstrado resultados promissores, a contínua investigação levará a uma gradual evolução do conhecimento, tanto ao nível dos cancros hematológicos, como nos tumores sólidos. A expressão do CAR nas diferentes moléculas efetoras, nomeadamente, as células T, tem atraído as grandes potências mundiais para aquela que poderá ser a chave das terapêuticas oncológicas.

Todavia, apesar de todas as garantias que esta estratégia nos dá, é fulcral ultrapassar as principais limitações associadas às células CAR-T, quer estejam relacionadas com questões de segurança ou de eficácia.

Neste sentido, esta monografia analisa as diferentes estratégias que poderão permitir produzir células CAR-T alogénicas *off-the-shelf* e, desta forma, colmatar todas as complicações associadas a esta tecnologia. O contínuo melhoramento das ferramentas conhecidas permitirá alcançar produtos CAR-T seguros, eficazes e eficientes que abrirão o caminho para o sucesso no campo oncológico.

Palavras-chave: células CAR-T, recetor quimérico antigénico, células autólogas, células alogénicas, células universais, *off-the-shelf*, doença *graft-versus-host*, edição de genes.

Abstract

CAR-T therapy is increasingly proving to be the most effective emerging immunotherapy in cancer treatment. Although it has already shown promising results, continuous research will lead to a gradual evolution of knowledge, both in terms of hematological cancers and solid tumors. The expression of CAR in different effector molecules, namely T cells, has attracted the great world players to what could be the key to cancer therapies.

However, despite all the guarantees that this strategy gives us, it is crucial to overcome the main limitations associated with CAR-T cells, whether they are related to safety or efficacy issues.

Therefore, this monograph analyzes the different strategies that could allow the production of off-the-shelf allogeneic CAR-T cells and, in this way, overcome all the complications associated with this technology. The continuous improvement of the familiar tools will make it possible to achieve safe, effective and efficient CAR-T products that will pave the way for success in the oncology field.

Keywords: CAR-T cells, Chimeric Antigen Receptor, autologous cells, allogeneic cells, universal cells, *off-the-shelf*, GVHD, gene-editing.

I. Introdução

As células CAR-T apresentam-se como uma disruptiva e emergente imunoterapia anti-cancerígena que, embora ainda em desenvolvimento, possui um enorme potencial no sentido de desencadear um novo paradigma de soluções inovadoras para as doenças oncológicas que, apesar da constante evolução científica e tecnológica, permanecem como uma área terapêutica cujas necessidades ainda não estão preenchidas.

As células CAR-T resultam de células T reprogramadas geneticamente através da expressão de um recetor quimérico antigénico (CAR), na sua superfície, que confere especificidade tumoral ao permitir o reconhecimento direcionado de antigénios que, de seguida, são apresentados às células T que desencadeiam citotoxicidade contra as células tumorais respetivas¹. Este mecanismo permite, às células CAR-T, matar as células tumorais, com base na identificação do antigénio de interesse².

Atualmente, já existem 4 terapias com células CAR-T aprovadas pela agência regulamentar Norte-Americana *Food and Drug Administration* (FDA). As primeiras terapias aprovadas à base de células CAR-T surgiram em 2017, **KYMRIAH**[®] (tisagenlecleucel) destinada à Leucemia Linfoblástica Aguda das células B (B-LLA), lançada pela Novartis³, e **YESCARTA**[®] (axicabtagene ciloleucel) para determinados tipos de linfomas associados às células B, pela Kite Pharma⁴, que marcaram o início de um novo paradigma científico no tratamento de doenças oncológicas. Em 2020, foi aprovada a terceira terapia CAR-T **TECARTUS**[®] (brexucabtagene autoleucel) para doentes com Linfoma de Células do Manto, pela Gilead⁵. O quarto produto aprovado pela FDA surgiu já em 2021 e corresponde ao **BREYANZI**[®] (lisocabtagene maraleucel) destinado a linfomas de células B, lançado pela Bristol Myers Squibb^{6,7}. Todos estes produtos têm como alvo o antigénio CD19, sendo estes a cara do sucesso que se vive nas terapias com células CAR-T direcionadas para os cancros hematológicos. Contudo, mais recentemente, a FDA aprovou a quinta terapia à base de células CAR-T, mais pormenorizadamente, o **ABECMA**[®] (idecabtagene vicleucel) com destino a doentes com Mieloma Múltiplo (MM), sendo este o primeiro produto direcionado para o antigénio de maturação de células B (BCMA) e não para o CD19, como os anteriores. À semelhança do **BREYANZI**[®], também o **ABECMA**[®] foi desenvolvido pela Bristol Myers Squibb, empresa que se encontra na vanguarda das terapias CAR-T⁸⁻¹⁰. Apesar do progresso tecnológico notório relativo aos **cancros hematológicos**, a tecnologia CAR-T não apresenta a mesma eficácia em doentes com **tumores sólidos** (melanoma, sarcoma, cancro da mama), pelo que demonstra uma atividade anti-tumoral limitada. Esta deve-se, de entre vários fatores, ao microambiente tumoral imunossupressor que tem uma ação bloqueadora sobre os agentes anti-tumorais, barreiras

físicas que impedem ou restringem a penetração das células CAR-T nos tumores, e a heterogeneidade antigénica tumoral em que poderão existir níveis de expressão de antígenos inferiores ao necessário para despoletar ação antitumoral¹¹.

Relativamente à estrutura geral dos CARs, estes apresentam-se sob a forma de complexos proteicos simples que foram manipulados para apresentarem a capacidade de debelar as células tumorais apresentando, essencialmente, 3 domínios com diferentes funções. Um **domínio extracelular** constituído por um fragmento variável de cadeia simples (scFv), de um anticorpo monoclonal, com a capacidade de reconhecer e ligar aos antígenos tumorais alvo que permite a ativação das células CAR-T^{12,13}. Assim, a ativação e proliferação das células T está dependente deste domínio de reconhecimento do antígeno tumoral. Um **domínio transmembranar** que permite a conexão entre o domínio extracelular e o domínio intracelular e é constituído pelos homodímeros das moléculas CD8 e CD3^{12,14}. Por fim, um **domínio intracelular** que funciona como um domínio de sinalização, sendo derivado da cadeia CD3ζ que ativa o sinal co-estimulatório^{15,16}. Esta porção do CAR é o principal alvo das várias alterações realizadas nas células CAR-T consoante as diferentes gerações que são desenvolvidas¹⁴. Várias têm sido as modificações feitas ao nível da estrutura do CAR com o objetivo de aumentar a atividade das células CAR-T, a sua proliferação e a libertação de citocinas, bem como diminuir a exaustão das células T¹⁷. Todas as alterações realizadas mantêm a estrutura base do CAR, e objetivam uma maior especificidade, eficácia e segurança^{12,18}.

Quanto à sua origem, as células CAR-T podem apresentar-se como autólogas ou alogénicas. Quanto às células CAR-T **autólogas**, estas são modificadas e administradas ao mesmo doente de onde foram coletadas, metodologia que apresenta desvantagens que não podem ser descartadas, daí a sua menção ao longo deste trabalho. Face a este panorama, surgem as células **alogénicas**, células com origem em dadores saudáveis que permitem ultrapassar as limitações associadas às células autólogas mas, ainda assim, mostram aspetos menos vantajosos, como veremos mais à frente. Atualmente, a chave para encarar todos os obstáculos que se encontram relativamente às células CAR-T é o desenvolvimento de uma terapia com células alogénicas ou células **off-the-shelf** que, entre outros fatores, oferecem a possibilidade de disponibilidade imediata e elevada potência a um custo mais reduzido¹⁹.

Desta forma, este trabalho terá como foco evidenciar a dualidade existente entre as células autólogas e as células alogénicas e, a partir deste pressuposto, discutir as vantagens das células alogénicas, algumas das suas limitações atuais e como contorná-las, bem como as diversas estratégias associadas à sua utilização que potenciam a evolução gradual deste

conceito que tem em vista o ambicioso projeto de criação de um banco de células CAR-T. Adicionalmente, abordará a importância da criação de uma biblioteca de células CAR-T, como chegar ao patamar de um produto *standard* nesta terapia e o que se perspectiva nas próximas gerações das CAR-Ts. Do mesmo modo, o propósito deste trabalho engloba, também, ilustrar as empresas na vanguarda desta tecnologia que se mostra com um potencial infindável, os novos produtos em ascensão - indissociáveis da tecnologia do CAR, como as células CAR-NK - e, por último, perspectivar o futuro das células *off-the-shelf* com o objetivo final de dar passos em frente no tratamento contra o cancro.

Concluindo, servirá para retratar o crescimento que se tem vindo a verificar no âmbito da imunoterapia com células CAR-T, mais pormenorizadamente, células alogénicas *off-the-shelf* que, cada vez mais, demonstram um enorme potencial dentro das terapias anticancerígenas.

2. Células CAR-T alogénicas *off-the-shelf*

2.1 A produção de Células CAR-T em perspectiva

O método de produção inicia-se com um processo de filtração de sangue especializada designado por **leucaferese**²⁰, o que permite que as células T sejam extraídas do sangue do próprio doente (células autólogas) ou de um dador saudável (células alogénicas). São imediatamente criopreservadas e enviadas para a unidade de produção, local onde são ativadas e reprogramadas através da incubação dos linfócitos T com vetores retrovirais, lentivírus ou retrovírus gama^{21,22}, que transportam o gene com a informação genética pretendida para o CAR, sob a forma de RNA que acaba por sofrer uma transcrição reversa^{20,22}. Dá-se, assim, a sua modificação genética para que passem a expressar na sua estrutura o CAR com capacidade de reconhecer células específicas. Nesta fase, podemos recorrer a várias tecnologias para alcançar células com características mais vantajosas ou capazes de contornar obstáculos inerentes ao processo de desenvolvimento desta tecnologia²³. De seguida, dá-se a amplificação das células resultantes da alteração genética, a remoção das células TCR+ (receptor de células T) remanescentes e a formulação do produto final para ser infundido no doente ou ser criopreservado para utilização futura¹⁶. O produto final obtido passará a ligar-se a células que expressem o antigénio alvo num processo MHC (*Major Histocompatibility Complex*) independente²⁴. É preciso ter presente a necessidade da realização de uma quimioterapia prévia à administração das células CAR-T, processo que vai conduzir a uma depleção linfocitária e outras células imunes no doente e conduzir a uma terapêutica com elevada eficácia, permitindo que as células CAR-T reprogramadas se expandam, proliferem e sejam bem aceites pelo doente^{25,24}. Desta forma, o produto final apenas pode ser injetado no doente

após a realização da quimioterapia linfodepletora e de um teste de controlo de qualidade rigoroso antes do envio das células para o local onde se encontra o doente^{21,26}. Na Figura 1 podemos ver a linha geral do processo de produção destas células.

Este processo que é a produção de CAR-Ts, no que diz respeito às células autólogas, demonstra-se sempre intensivo e de elevado custo e pode chegar a demorar 28 dias, sendo que, a quantidade de produto obtido pode variar de doente para doente. Assim sendo, um produto *off-the-shelf* apresenta, como veremos mais à frente, uma miríade de diferenças que possibilitam o desenvolvimento de um programa terapêutico mais eficiente, benéfico e acessível a uma multiplicidade de doentes²¹.

Até aos dias de hoje, os ensaios clínicos têm como principal foco a minimização de variabilidade entre ensaios e de custos de produção. O futuro perspectiva uma nova vaga de tecnologia que possibilitará o desenvolvimento de um processo de produção *low-cost*, mais automatizado e reprodutível²⁶.



Figura 1. Fluxo do processo de produção de células CAR-T (Adaptado²⁰).

Inicia-se com a obtenção de uma amostra de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) por aferese, todavia, além do conteúdo rico em linfócitos, vamos obter glóbulos vermelhos, plaquetas e granulócitos. A quantidade destes grupos celulares varia consoante o doente, tipo de tumor, equipamento e, até, operador²⁷. O produto obtido da aferese é, então, sujeito a lavagens sucessivas para remover os anticoagulantes adicionados durante o processo. Posteriormente, há a separação das células por tamanho e densidade através de uma *counterflow centrifugal elutriation*²². É, desta forma, que conseguimos o enriquecimento mais efetivo do produto final em linfócitos T para uso direto ou preservação. Dá-se a depleção específica de células para que se obtenham apenas os linfócitos T que, de seguida, são estimulados a proliferar e diferenciar. A ativação das células T dá-se por interações entre o TCR com células dendríticas e moléculas co-estimulatórias^{22,26}. Quanto à reprogramação genética, é feita, maioritariamente, através de retrovírus (vetores retrovirais gama) ou lentivírus - vetores lentivirais são os que apresentam uma integração genética mais segura - que permitem uma elevada eficiência na

transdução²². As células sofrem expansão até um determinado número de células pretendido e a sua quantidade e composição do meio são ajustados de acordo com a formulação terapêutica²⁶.

2.2 Ultrapassar as limitações das células CAR-T autólogas

Atualmente, as terapias CAR-T autólogas mostram-se com uma reduzida aplicabilidade prática. Embora tenham surgido como inovadoras e revolucionárias e, inclusive, mostrado resultados eficazes em alguns tipos de cânceros hematológicos como a Leucemia Linfoblástica Aguda das células B (B-LLA) e o Linfoma Difuso de Grandes células B (DLBCL), várias foram as limitações que acabaram por comprometer o futuro desta terapia. Apesar de estarem associadas a uma ausência de reação alogénica, o que permite um maior período de resistência das CAR-Ts, existem diversas desvantagens inerentes à sua utilização.

As limitações mais impactantes desta terapia englobam o **elevado custo de produção**²⁸ e o **elevado tempo de produção** que pode chegar a demorar 2 a 3 semanas²³, o que, além da contínua progressão da doença²⁸, pode resultar numa falha do processo de produção que, inevitavelmente, induz um atraso na disponibilidade do tratamento e pode fazer com que os utentes fiquem ilegíveis para o mesmo²³. Considerando que as células autólogas são colhidas do próprio doente, podem ocorrer **falhas e dificuldades inerentes à colheita e produção** destas células visto que os doentes são, normalmente, linfopénicos devido a uma quimioterapia prévia ou à doença em questão associada e, conseqüentemente, constituem um grupo de risco²⁸. Uma vez que esta é uma terapia em que as células são produzidas individualmente para cada utente, vamos assistir a uma constante **variabilidade no fenótipo e prevalência de células T** em cada caso, o que vai culminar em resultados inconstantes sempre que se obtém este produto, ou seja, **variabilidade no produto final**²⁹. Outro fator a considerar é o possível **risco de contaminação** com células tumorais em doentes com uma doença refratária que provoque a existência de células malignas na circulação sanguínea aquando da realização da leucaferese. Como consequência, estas células farão parte da colheita e, desta forma, transduzidas por meio do vetor viral responsável por codificar o CAR para a superfície da célula, o que leva à sua proteção face à ação das células CAR-T^{28,29}. Por fim, a eficiência das células CAR-T autólogas poderá ficar comprometida devido a um **disfunção das células T**, resultado do ambiente imunossupressor do tumor que provoca uma diminuição ou alteração da função das células T que passam a ser um veículo enfraquecido e insuficiente para o objetivo do tratamento^{23,29}.

Apesar de dominarem o espaço clínico, as células autólogas levantam demasiadas preocupações de segurança, custos e logística, o que torna esta intervenção um complexo desafio para os sistemas de saúde^{23,30}.

2.3 Vantagens das células alogénicas

As CAR-Ts alogénicas apresentam-se como um campo relativamente recente face ao panorama das células autólogas, contudo demonstram um rápido e exponencial crescimento em direção à evidência clínica. Este produto aparece como a potencial solução para as limitações das células autólogas através de uma disponibilidade imediata e benefício a longo prazo³⁰.

As características deste produto alogénico vêm colmatar as desvantagens apresentadas pelas células autólogas como, por exemplo, um **custo reduzido** através da standardização do perfil do produto consoante o doente e da implementação de um processo de produção industrializado e escalável, a partir do qual um grande número de células CAR-T pode ser produzido com origem num único dador saudável^{30,31}. Assim sendo, garante a oportunidade de **beneficiar um número muito maior de doentes** através de um único lote e fornecer células suficientes para produzir um enorme número de doses²³. A possibilidade de preparar o produto previamente e este estar pronto a administrar quando necessário permite o **tratamento imediato dos doentes**, evitando a progressão da doença e minimizando falhas durante o processo²³. Outro aspeto de destaque é o potencial que esta tecnologia demonstra para **otimizar a dose de cada utente e o perfil de segurança** ao longo do tratamento, o que dá uma garantia de segurança e confiança³⁰. Finalmente, esta tecnologia permite **modificações na estrutura do produto** com vários intuitos, desde a manipulação genética das células, estratégias de manipulação do TCR, entre outros mecanismos com o objetivo final de alcançar o melhor produto para um determinado doente. Existe, ainda, a hipótese de combinação de células CAR-T direcionadas a diferentes alvos²³.

Concluindo, a possibilidade que este processo alogénico garante de produzir vários lotes de células e, posteriormente, criopreservá-las, permite o estabelecimento de uma terapia *off-the-shelf* com uma maior segurança, sem atrasos na produção e com uma rápida e fácil dispensa de doses e re-doses²⁹.

2.4 Desafios das células alogénicas

Uma terapia alogénica com base em células T de dadores saudáveis acaba por introduzir potenciais riscos associados à sua histocompatibilidade, uma vez que possuem uma identidade imunológica desconhecida. Atualmente, o desafio passa por desenvolver células *off-the-shelf* e, simultaneamente, contornar as problemáticas associadas à sua utilização, mais concretamente, a **doença graft-versus-host** (GVHD) e a **rejeição das células alogénicas**²⁹. Quanto à sua prevalência, uma vez que, como já fora mencionado, existe uma progressiva inclusão da

quimioterapia no processo de produção, a GVHD mostra-se um evento cada vez mais raro comparativamente à rejeição das células, sendo que deve haver uma preocupação permanente com estes dois fenómenos¹⁹. Nestes casos, os doentes imunocomprometidos correm um maior risco de desenvolver GVHD, enquanto doentes imunocompetentes são mais propensos a rejeitar o produto administrado¹⁹.

É fulcral considerar alguns conceitos para interligar a utilização das células alogénicas à sua problemática. Assim sendo, numa fase inicial as células T convencionais MHC-restritas mostravam características atrativas para o tratamento de cancro como a sua robustez, memória e especificidade seletiva garantida pelo seu recetor³². O TCR é o responsável pelo reconhecimento dos antígenos, na forma de peptídeos, apresentados pelas moléculas de MHC próprias do indivíduo³³. O MHC consiste num *cluster* de genes que codificam moléculas essenciais na ativação das células T. A sua principal função é ligar-se a fragmentos peptídicos inseridos no interior da célula e expô-los à sua superfície para serem reconhecidos pelas células T, ou seja, permite ao sistema imune discriminar entre substâncias próprias do organismo ou estranhas ao mesmo, o que possibilita a identificação de sinais de infeção ou dano³². A maturação das células T acontece no timo, local em que recebem um sinal de sobrevivência e formam um repertório de células T, cuja interação é restrita às moléculas MHC do hospedeiro. Assim, as células T maduras ao reconhecerem os complexos MHC com peptídeos estranhos ao organismo iniciam uma resposta imune³³.

Estabelecendo a ponte para a doença *graft-versus-host*, esta resulta de uma incompatibilidade por parte das células T, provenientes dos doadores, em reconhecerem o MHC - sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) em humanos - do doente através do TCR, o que desencadeia um ataque aos tecidos do doente²³. Este problema tem origem numa reação de alorreatividade que consiste no reconhecimento, pelas células T, de complexos MHC-peptídeo-alogénicos que, logicamente, não foram encontrados no processo de desenvolvimento tímico do MHC³³. Ou seja, os processos de seleção na maturação tímica resultaram no estabelecimento de um repertório do TCR para este ser tolerante apenas a peptídeos próprios apresentados por MHCs próprias. Ao existir uma interação com moléculas MHC desconhecidas ou moléculas MHC com peptídeos polimórficos, é inevitável que haja o desenvolvimento da GVHD (aloreação das células T do dador contra os tecidos do doente)²³. Esta disparidade no HLA entre o dador e o recetor origina uma resposta imune extensa, sendo esta a causa principal do perigo de vida associado a esta terapia²³, pelo que, para desenvolver células CAR-T alogénicas seguras, a GVHD deve ser prevenida.

Quanto à rejeição das células alogénicas, assim que as células T do doente reconhecem que o produto infundido é incompatível, este passa a ser rejeitado pelo organismo. Como consequência desta rejeição, a farmacocinética e futuros *outcomes* clínicos tornar-se-ão imprevisíveis, bem como haverá o desenvolvimento de células de memória no sistema imune que irão facilmente rejeitar futuras infusões de produtos *off-the-shelf* do mesmo dador¹⁹. Nem sempre é possível encontrar um dador com um HLA totalmente compatível. O desejável seria ter um produto rapidamente acessível capaz de se adequar a todos os doentes, independentemente do seu tipo de HLA²⁸.

Adicionalmente, além das desvantagens mencionadas, podemos-nos deparar com outros desafios decorrentes da utilização destas células como, por exemplo, a **expansão das células alogénicas**, bem como a sua **persistência**²⁹.

2.5 Prevenção da problemática das células alogénicas

No sentido de abrir caminho para o futuro desta tecnologia, foi imperativo implementar melhorias nas células CAR-T alogénicas com o objetivo de continuar a expandir horizontes no tratamento do cancro. Assim sendo, existem várias estratégias cruciais para que exista um desenvolvimento contínuo de CAR-Ts alogénicas tendo em conta o risco de aloimunização²³.

As células CAR-T são, também, caracterizadas pelo seu reportório do TCR. Até aos dias de hoje, a maioria das terapias, a nível clínico, têm utilizado os convencionais TCRs $\alpha\beta$ ³⁴ - recetores com um heterodímero constituído por 2 cadeias peptídicas α e β ³⁵. As células T convencionais $\alpha\beta$ expressam HLAs específicos e constituem a maioria das células T em circulação no corpo humano³⁴. Além da sua restrição ao nível do HLA, estas células convencionais ainda demonstram outras limitações como um fraco acesso a tumores não inflamados²³ e um reconhecimento dos peptídeos antigénicos constantemente associados a moléculas HLA³⁶. Como veremos mais à frente, as células T podem ter diversas origens, o que pode ser um ponto de partida para solucionar os problemas associados a esta terapêutica. Ainda, a falta de complementaridade do HLA entre dador e recetor deve-se, principalmente, à baixa disponibilidade de dadores compatíveis, o que implica, obrigatoriamente, a necessidade de recorrer a células T alogénicas modificadas e manipuladas²⁹.

São vários os aspetos a partir dos quais podemos tomar uma iniciativa e avançar para metodologias que tragam benefícios na utilização das CAR-Ts alogénicas e impeçam a ocorrência dos seus aspetos negativos. Atualmente, já são vários os ensaios clínicos que demonstram elevada eficácia utilizando os procedimentos a seguir mencionados¹⁹. Assim

sendo, são diversas as estratégias que estão a proporcionar uma afirmação desta tecnologia no espaço terapêutico de tratamento do cancro.

2.5.1 Doença Graft-Versus-Host

A GVHD revela-se a principal problemática associada às terapias CAR-T. A sua manifestação acontece, essencialmente, devido à reação das células T aloreativas de uma dador saudável. Desta forma, este fenómeno explica-se através de três mecanismos: pela atividade das células T alogénicas que causam a morte do tecido celular do doente em questão, ação esta que é mediada pela contínua expressão de elementos da família do Fator de Necrose Tumoral (FNT) como, por exemplo, o ligando Fas (FasL); pela contínua libertação de conteúdo granular intracelular como a perforina, a serina protease ou a granzima B; ou, pela libertação de moléculas TNF α e IFN γ (citocinas com perfil de uma resposta imune polarizada para as células T *Helper* 1 - o que, conseqüentemente, inibe a via T *Helper* 2 - que resulta numa extensa ativação e expansão das células T³⁷) que contribuem para a citotoxicidade celular. Por esta razão, tornou-se indispensável o desenvolvimento de estratégias para administrar células CAR-T alogénicas com o menor risco possível de GVHD^{23,38}. Assim sendo, as seguintes metodologias permitem a aspiração ao sucesso desta tecnologia.

2.5.1.1 Edição de genes

Além da reprogramação genética feita para introduzir o vetor viral que dá origem ao CAR na estrutura das células T, muitas outras modificações podem ser feitas, a nível genético, para atingir um determinado patamar com o nosso produto final.

A edição de genes é a técnica mais utilizada e promissora para o desenvolvimento de células CAR-T alogénicas e, também, para exponenciar a sua atividade, quer seja pela minimização dos problemas a elas associados (GVHD), quer seja pela contribuição para a obtenção de um produto universal, fácil de produzir e, conseqüentemente, *off-the-shelf*⁷. O típico TCR $\alpha\beta$ é o principal fator responsável pela alorreatividade das células T convencionais, daí muitas das manipulações genéticas existentes a nível clínico se basearem na alteração, inibição ou remoção do TCR presente na superfície das células T convencionais²³. Por exemplo, é possível originar células CAR-T em que não é obrigatório que exista compatibilidade do haplótipo de HLA, o que, por si só, permite ultrapassar as dificuldades de fazer coincidir células do dador e do recetor²⁸.

O processo de edição genética acaba por ser semelhante nas diferentes estratégias existentes, sendo que começa com a clivagem da dupla cadeia de DNA, através de uma

nuclease, numa localização específica. Os mecanismos de reparação de DNA são ativados e vão originar um de dois efeitos possíveis: **gene knock-out**, ou seja, inativação do gene afetado; **gene knock-in**, isto é, inserção ou correção do gene afetado²³. Uma vez que o gene da cadeia β do TCR tem duas regiões constantes, a intervenção genética prevalente vai ser ao nível do gene da cadeia α que apenas apresenta uma região constante, o que permite uma intervenção mais direta e eficiente na modificação do TCR $\alpha\beta$. Deste modo, a eliminação da expressão do $\alpha\beta$ TCR da superfície das células T pode ser feita por *knock-out* dos exões da cadeia constante α do TCR (TRAC) ou das cadeias constantes β 1 e 2 do TCR (TRBC 1 e TRBC 2), por utilização de diversos sistemas como CRISPR/Cas9, TALEN, ARCUS, Cas-CLOVER, Nucleases de Dedo de Zinco (NDZ) e Nucleases megaTAL^{28,39}. Todas estas técnicas necessitam de ser acompanhadas de um passo de purificação para remover eventuais resíduos de células $\alpha\beta$ TCR positivas, pelo que a sua eficácia é crucial para diminuir o risco de contaminação com este tipo de células passíveis de induzir GVHD²⁹. De seguida, encontra-se o aprofundamento de algumas estratégias desenvolvidas a partir da edição de genes:

Remoção TCR (TRAC e TRBC)

Uma vez que, apenas a estrutura completa do TCR pode ser transportada para a membrana celular, se houver uma alteração em qualquer um dos seus componentes, vamos prevenir a sua expressão funcional na superfície das células T. Outra técnica bastante utilizada, neste âmbito, é a remoção do TCR através do **knock-out** de um ou dois genes que codificam para os componentes do complexo do TCR, seja a TRAC, o TRBC ou a CD3 ζ ¹⁹.

Todavia, alguns estudos pré-clínicos já demonstram que o **knocking-in** do CAR diretamente no locus da TRAC, além de anular a expressão do TCR endógeno, aumenta a função das células CAR-T. Desta forma, o transgene do CAR substitui o gene da TRAC prevenindo, assim, a formação do TCR e, conseqüentemente, a sua expressão.

Com base no acima referido, uma ação ao nível do TCR acaba por ser fulcral para causar a disrupção do locus e, assim, promover o objetivo que se pretende alcançar de mitigar o risco de GVHD¹⁹.

Sistema CRISPR/Cas9

Apresenta-se como uma tecnologia inovadora com potencial no sentido de desencadear novas perspectivas quanto ao desenvolvimento de novas gerações de células CAR-T, pela sua flexibilidade, simplicidade e elevada eficiência⁴⁰.

O sistema CRISPR/Cas9 consiste numa ferramenta capaz de localizar e editar (reparar) um gene não pretendido através do emparelhamento de bases complementares RNA-DNA. Resulta da combinação de uma curta molécula de RNA e uma nuclease Cas9. A nuclease Cas9 atua como uma “tesoura molecular” sendo responsável por quebrar a dupla cadeia de DNA numa localização genómica especificada por um RNA *guide* (gRNA) que é propositadamente complementar a esta região, o que vai levar a inserções ou deleções no gene alvo. O resultado destas inserções e deleções de nucleótidos acaba por se manifestar em mutações *non-sense* e perda funcional do gene⁴⁰. Estas alterações no DNA são, de seguida, reparadas *por non-homologous end joining* (NHEJ) ou *homology-directed repair* (HDR)⁴¹. Com base no referido, são várias as estratégias desenvolvidas recorrendo a este sistema como, por exemplo, induzir o **knock-out** de genes ao nível do TCR, da MHC ou de determinados antigénios para alcançar células CAR-T alogénicas universais⁴¹. Assim sendo, esta é uma metodologia bastante apelativa que possibilita a superação da alorreatividade das células CAR-T, bem como a possibilidade de aumentar a sua potência e eficácia⁴⁰.

Apesar de todo este racional, há pontos a ter em conta que se apresentam, de certa forma, como desvantagens e desafios a ultrapassar. Um exemplo é a possibilidade de ocorrerem clivagens *off-target* ou translocações espontâneas durante a edição de genes, situação que deve ser evitada devido aos efeitos adversos que podem decorrer de uma alteração ou inativação de genes não pretendidos²³.

TALEN

A tecnologia TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) foi a primeira a ser usada em doentes para a remoção de $\alpha\beta$ TCR²⁹. Consiste em moléculas híbridas de proteínas de reconhecimento de DNA associadas a uma endonuclease com a capacidade de cortar sequências específicas de DNA. A sua utilização acaba por incidir ao nível do gene do TRAC, o que acaba por eliminar o potencial das células T em reagirem ao produto alogénico e, assim, é possível evitar o desenvolvimento da GVHD. Adicionalmente, para certificar que não restam células T alorreativas, a TALEN vai atuar, concomitantemente, ao nível do gene CD52. Eliminada a expressão deste gene na superfície das células T, estas tornam-se resistentes ao anticorpo monoclonal anti-CD52 - alemtuzumab - que poderia ser usado para eliminar células T do hospedeiro que expressassem o CD52, permitindo a obtenção de células T do hospedeiro TCR e CD52-deficientes, e facilitando a entrada e aceitação das células CAR-T alogénicas no hospedeiro^{23,42}.

Este processo acaba por permitir a produção de células CAR-T *off-the-shelf* saudáveis, uma vez que não existirá a expressão do TCR e da CD52 no hospedeiro. Por fim, as células CAR-T editadas pelas TALEN não induzirão GVHD e serão resistentes à destruição pelo alemtuzumab, podendo ser usadas para a geração de células universais⁴³.

ARCUS®

Plataforma de edição de genes versátil e altamente específica, patenteada pela Precision BioSciences. Objetivamente, a ARCUS é uma *next-generation meganuclease platform* que permite a produção de nucleases com atividade e especificidade customizadas, pelo que são capazes de distinguir os locais alvo com grande sensibilidade. Além de constituir uma plataforma mais segura e com menos riscos de clivagens *off-target* face a outras tecnologias e nucleases com o mesmo objetivo, possibilita edições genéticas mais específicas através do recurso a uma enzima de edição de genes - endonuclease I-Crel - que evoluiu na natureza para fazer uma única, mas altamente específica, edição no DNA. As funções desta plataforma passam por: eliminar genes que levem o sistema imune do doente a atacar as células alogénicas; eliminar genes que induzam as células T do dador a atacar os tecidos saudáveis do hospedeiro; inserir informação genética num local específico do genoma das células T para as direccionar para um determinado alvo no tumor; inserir outros genes que confirmam benefícios para o doente^{44,45}.

Atualmente, a Precision BioSciences está a desenvolver três ensaios clínicos que tentam implementar meganucleases específicas para editar células CAR-T para o tratamento de MM, LLA e LLC (Leucemia Linfocítica Crónica)⁴⁵.

Cas-CLOVER

Sistema que surge como uma inovação à tecnologia do CRISPR/Cas9. Tal como a CRISPR/Cas9, também a Cas-CLOVER é uma estratégia de edição de genes mas com algumas diferenças como o facto de recorrer a duas moléculas de gRNA, o que torna esta tecnologia altamente restritiva, e de só funcionar quando os dois gRNAs existem - *dual gRNA-guided nuclease*⁴⁶. Desta forma, o sistema utiliza dois gRNAs separados para guiar a enzima ao local de ação e consiste numa Cas9 cataliticamente inativa fundida a uma endonuclease de restrição tipo IIS designada Clo-51. A atividade da Clo-51 depende da sua própria dimerização, o que limita o efeito de clivagem *off-target* característica na tecnologia CRISPR-Cas9⁴⁷.

Considera-se que esta estratégia combina o melhor das tecnologias CRISPR-Cas9 e TALEN, uma vez que tem a eficiência da primeira, já que recorre também a um gRNA e uma

Cas9 inativa, e a especificidade do sistema TALEN ao utilizar dois gRNAs. Desta forma, o Cas-CLOVER apresenta-se como mais um mecanismo para desenvolver produtos CAR-T *off-the-shelf* com segurança e eficácia⁴⁸.

Nucleases de Dedo de Zinco (NDZ)

A tecnologia NDZ foi a primeira ferramenta de edição de genes a ser amplamente aplicada. As NDZs resultam da fusão de um domínio de ligação ao DNA específico com um domínio de clivagem de DNA não específico pertencente à enzima de restrição Fok-I tipo II. Pormenorizando, as NDZs são a união de proteínas de dedo de zinco multiméricas à endonuclease Fok-I. Este complexo vai ter a capacidade de clivar DNAs dupla cadeia em locais específicos, o que vai resultar numa recombinação homóloga ou NHEJ e, assim, alcançar as alterações pretendidas. A ligação de várias proteínas dedos de zinco permite criar um reconhecimento dos locais alvo com elevada especificidade⁴⁹. Sendo que cada unidade dedo de zinco reconhece três nucleótidos, são reunidas 3 a 6 proteínas dedo de zinco para gerar um domínio de ligação ao DNA que reconheça uma sequência de DNA de 6 a 8 pares de bases²³.

Este mecanismo das NDZs vai permitir realizar, por exemplo, *knock-out* de genes como o TCR e, conseqüentemente, evitar que haja indução de GVHD por reconhecimento do produto alogénico.

MegaTAL

Caracterizam-se por serem proteínas híbridas que resultam da fusão de um TALE com uma endonuclease de sequência específica, ou seja, a região de ligação ao DNA do TALE é usada para corresponder a um local específico de uma meganuclease que se encontra adjacente a um local genómico alvo específico. Esta arquitetura permite a geração de nucleases compactas extremamente ativas e específicas. Este complexo, designado megaTAL, promove a clivagem do DNA genómico com elevada especificidade e eficiência^{50,51}.

Inibição do TCR

No que diz respeito à inibição ao nível do TCR $\alpha\beta$, o objetivo é expressar proteínas artificiais com a capacidade de reter, intracelularmente, um ou mais componentes do TCR. Neste sentido, recorre-se a **bloqueadores da expressão de proteínas (BEP)**, mais pormenorizadamente a proteína CD3 ζ , que conseguem o enclausuramento das subunidades da CD3 ζ ao nível intracelular através de um ligando de cadeia simples anti-CD3 ζ que se encontra ancorado no retículo endoplasmático¹⁹. Resumindo, conseguimos anular a expressão

e sinalização mediada pelo recetor TCR através de BEP anti-CD3 ζ , que consistem na combinação de um fragmento variável de cadeia simples, derivado de anticorpos, específico para o CD3 ζ com 21 sequências de aminoácidos diferentes⁵².

Do mesmo modo, outra alternativa para reduzir a funcionalidade do TCR passa por reforçar a expressão de uma pequena molécula designadas **Molécula Inibitória do TCR** (MIT). Investigadores têm obtido resultados interessantes com este antagonista competitivo do local de ligação do TCR. A interação com a MIT vai originar um TCR incapaz de induzir o mecanismo de sinalização, mesmo que seja estimulado, ou seja, tal como o exemplo anterior, vamos ter um bloqueio da função efetora das células T aloreativas $\alpha\beta$ ¹⁹.

Apesar de serem duas estratégias que ainda se encontram em desenvolvimento clínico e pré-clínico, mostram-se, cada vez mais, como alternativas eficazes e desbloqueadoras do paradigma a que assistimos.

2.5.1.2 Células T universais

Os tipos de células mencionados nesta secção aparecem como uma alternativa à utilização das células T convencionais (TCR $\alpha\beta$) que, como já foi referido, expressam TCRs restritos quanto ao seu HLA, pelo que facilmente levam ao desenvolvimento de GVHD. Uma alternativa a esta limitação passa por utilizar células T provenientes de doadores com carácter universal - células T não- $\alpha\beta$ TCR - como os subtipos que veremos a seguir³⁴.

Células NK

As células NK revelam-se uma plataforma de grande interesse na sequência da sua capacidade em contribuir para um efeito *graft-versus-tumor*, ao invés da GVHD. Fazem parte da vertente inata do sistema imune e conseguem ter uma ação dirigida para células cancerígenas que regulam negativamente moléculas de HLA classe I. Constituindo uma inovação na área da imunoterapia, foram inicialmente estudadas pela sua eficácia em matar células tumorais, sendo parte integrante do sistema de imunovigilância tumoral do organismo. Como consequência da baixa concentração destas células NK no sangue periférico, foram desenvolvidas estratégias para as enriquecer e expandir *ex vivo*. Por exemplo, a linha celular NK92 foi aprovada em humanos e pode constituir uma fonte renovável de células CAR-NK, após a sua manipulação genética para expressar o CAR^{23,53}.

Desta forma, reúnem características, desde as propriedades inatas ao baixo risco de GVHD, que as tornam uma alternativa viável às células T convencionais. A associação das células NK com a estrutura do CAR demonstra um elevado potencial e efetividade contra

cancros hematológicos, além das suas características que permitem uma utilização alogénica sem comprometer a saúde do doente⁵³.

Células T $\gamma\delta$

O TCR apresenta uma organização diferente consoante o tipo de células T. No caso das células T $\gamma\delta$, ao invés de possuírem uma cadeia α e uma cadeia β , vão apresentar uma cadeia γ e outra δ associadas a proteínas acessórias CD3²³. Contrariamente ao que acontece nas células T convencionais, as células T $\gamma\delta$ reconhecem os seus ligandos independentemente do processamento do antigénio e da restrição do MHC/HLA, ou seja, permitem expansão *in vivo* sem causar GVHD³⁶. A sua capacidade de reconhecer alvos de forma MHC-independente garante um baixo risco de alorreatividade e, conseqüentemente, aumenta o potencial da utilização células $\gamma\delta$ alogénicas enquanto terapia CAR-T⁵³.

Apesar de constituírem apenas 1 a 5% dos linfócitos em circulação, encontram-se predominantemente em locais epiteliais específicos do organismo como o intestino, língua e pele. A sua predominância ao nível dos tecidos faz desta classe de células uma plataforma bastante atrativa, uma vez que uma das limitações das células T $\alpha\beta$ era o fraco acesso aos tumores não inflamados²³.

Esta classe de células T, além da expressão do $\gamma\delta$ TCR, também exibe na sua constituição recetores NK como, por exemplo, o recetor NKp30 ou o NKG2D, que vão contribuir para o aumento da citotoxicidade contra as células tumorais⁵⁴. A população dominante na família dos linfócitos T $\gamma\delta$ presente, a nível sistémico, em adultos saudáveis expressa um TCR composto por um gene variável V γ 9 emparelhado com o gene V δ 2. A informação do gene variável δ determina a função e a localização das células T $\gamma\delta$, pelo que a subpopulação V γ 9V δ 2 predomina no sangue periférico³⁴.

Considerando que as células $\gamma\delta$ podem ser utilizadas com segurança numa perspetiva alogénica e demonstram reatividade anti-tumoral natural, se foram dotadas de uma plataforma CAR, surgem com um enorme potencial para, de forma segura, desenvolver CARs alogénicas⁵⁵. Concluindo, as células T $\gamma\delta$ apresentam-se, cada vez mais, como uma alternativa às células T convencionais e como uma promissora plataforma alogénica no campo oncológico.

Células T CDI (lipídeo)-restritas

Além das células T clássicas que reconhecem epítomos peptídicos específicos apresentados pelas moléculas MHC, o sistema imune apresenta células T não convencionais

não MHC-restritas, pelo que têm a capacidade de reconhecer especificamente antígenos lipídicos apresentados por moléculas CDI. Ao contrário das moléculas MHC convencionais, as moléculas CDI apresentadoras de antígeno são não polimórficas, pelo que são especializadas na apresentação de antígenos lipídicos a células T CDI-restritas^{56,57}. A família de moléculas CDI, em humanos, é constituída por 5 membros: CD1a, CD1b, CD1c pertencentes ao grupo 1, CD1d inserido no grupo 2 e o CD1e do grupo 3. Apresentam-se em circulação nos diferentes compartimentos secretores e endossomais das células, contudo, até hoje, apenas um número limitado de antígenos CDI-restritos são conhecidos³⁴. Além do reconhecimento de antígenos lipídicos próprios do organismo, reativos contra as próprias células e que se acumulam durante o stress celular causado pelo cancro, também permitem reconhecer aqueles que são derivados de patógenos infecciosos^{34,56}. A expressão das moléculas CD1a, CD1b e CD1c é induzível e limitada a um conjunto de células apresentadoras de antígenos (CAA), enquanto que a CD1d é a única expressa constitutivamente e em todas as CAA³⁴.

As células T CD1d-restritas, também designadas células NKT, estabelecem a ponte entre resposta imune inata e adaptativa. São classificadas em dois grupos consoante a sua capacidade em reconhecer a α -galactosilceramida (α -GalCer): células NKT tipo 1, ou iNKT (células NKT invariáveis), que expressam um TCR muito específico constituído por uma cadeia α invariável emparelhada com um número limitado de cadeias β capaz de reconhecer a α -GalCer; células NKT tipo 2, ou dNKT, que expressam um repertório do TCR mais diversificado e não respondem à α -GalCer. A α -GalCer é um glico-esfingolípido que atua como um potente estimulador das células iNKT. Os tumores têm a capacidade de provocar uma desregulação na produção lipídica, fenómeno que vai constituir uma fonte de antígenos lipídicos capazes de estimular as células iNKT. Assim que se dá a ativação do TCR, as iNKT rapidamente começam a libertar citocinas ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL4, IL13 e IL17) e grânulos líticos (perforina e granzima) e regulam positivamente os recetores de morte da célula através das proteínas FasL e TRAIL. Desta forma, podemos aferir a grande habilidade das células iNKT em matar células tumorais CD1^+ e células supressoras do sistema imune através da sua citotoxicidade, a forte capacidade em modular o microambiente tumoral, bem como a aptidão para organizar, simultaneamente, a resposta por parte das células NK e das células dendríticas³⁴. Também é possível verificar que, além de permitirem a libertação de citocinas que induzem uma polarização Th1 ($\text{IFN}\gamma$), também existe libertação de citocinas que induzem uma polarização Th2 (IL4 e IL13), sendo este equilíbrio imunoregulador um dos fatores chave para a regressão da GVHD³⁷.

A importância das células iNKT como um elemento importante na imunidade anti-tumoral é evidente através da relação factual em que indivíduos com câncros hematológicos com menor frequência destas células, revelam um pior prognóstico. Desta forma, quanto maior for a percentagem de células iNKT no conteúdo transplantado, maior será a proteção contra a GVHD aguda. Do mesmo modo, uma rápida e precoce reconstituição dos níveis de iNKT pós-transplante vão possibilitar uma melhor recuperação do doente³⁴.

Concluindo, a utilização de células iNKT de dadores saudáveis mostra-se como uma opção com uma tremenda viabilidade, não só pelo facto de serem moléculas não polimórficas (sem restrições ao nível do HLA) e de permitirem uma potencial proteção contra a GVHD, mas também porque um pequeno número de células iNKT permite a obtenção de resultados robustos *in vivo*, pelo que apenas requerem pequenas amostras dos dadores intervenientes^{34,37}. Todas estas características tornam as células T CDI-restritas numa família de células T universal e numa população interessante para o desenvolvimento *off-the-shelf*, ainda que tenham de ser realizados ensaios clínicos que avaliem a sua segurança, persistência, disponibilidade e eficácia²³.

2.5.1.3 Células CAR-T alogénicas derivadas de dador de transplante de células estaminais (TCE)

Uma estratégia válida, sem recorrer à edição de genes, poderia ser esta administração de células CAR-T alogénicas com origem no dador inicial do TCE²³. Esta prática de transplantar células estaminais é comum em doentes com elevado risco de B-LLA²⁸.

Contudo, apenas pode ser aplicada em condições específicas, como é o caso dos indivíduos que receberam um TCE alogénicas e sofreram relapso. Exclusivamente nesta situação podemos considerar a administração de as células CAR-T derivadas do próprio dador de transplante, sem qualquer outra intervenção adicional²³. Existem vários resultados clínicos que indicam que, nestas condições, a administração de células CAR-T com origem no próprio doente não levam ao surgimento de GVHD, o que se deve ao facto de existir um elevado grau de semelhança entre o HLA do doente e do dador²⁸. Inclusive, os resultados equacionam a hipótese de, nestes casos, a infusão de células CAR-T autólogas permitirem reforçar uma reação *graft-versus-tumor* sem aumentar o risco de GVHD²³. Desta forma, não existiria a preocupação de compatibilidade do HLA, uma vez que as células CAR-T infundidas teriam a mesma origem que as células previamente administradas.

Por outro lado, embora as células estaminais transplantadas providenciem uma fonte de células alternativa, estas não se encontram *off-the-shelf*. Ou seja, a sua disponibilidade não é imediata derivado de ter de haver produção para cada doente em específico²⁸.

2.5.1.4 Células T de memória vírus-específicas *off-the-shelf*

Com base em ilações retiradas da estratégia acima mencionada, associada ao TCE, surgiu a hipótese de utilizar células T vírus-específicas (VST) que já haviam sido utilizadas no tratamento de infeções virais⁵⁸. As VST provenientes de dadores apenas apresentam uma compatibilidade parcial ao nível do HLA⁵⁹. Tendo em conta que o risco de alorreatividade é proporcional à quantidade de células T e à diversidade de reportório do TCR³⁹, a possível explicação para a ausência de GVHD pode ser o reportório restrito e pouco diversificado destas células T de memória²³.

A metodologia consiste em purificar as VST de memória que, por si só, conferem proteção contra doenças virais sem manifestar sinais clínicos de desenvolver GVHD e, por conseguinte, utilizar estas células como produto alogénico na nossa terapia²³. Atualmente, a utilização de VST com origem em dadores saudáveis tem vindo a demonstrar efeito, a nível clínico, contra diferentes tipos de vírus como o Vírus *Epstein-Barr* (EBV), o citomegalovírus (CMV) ou o adenovírus. Nestes ensaios clínicos, poucos foram os doentes que revelaram reações de alorreatividade ou GVHD pelo que a sua segurança torna interessante a sua utilização³⁴.

Assim sendo, as VST podem ser obtidas de múltiplos dadores saudáveis, cada um com diferentes alelos de HLA, de forma a obtermos um banco de VSTs em larga escala com base nas restrições de HLA²⁹. Ainda assim, este conjunto de dadores deve ser, ainda que limitado, bem caracterizado e bem escolhido de forma a cobrir, ao nível da compatibilidade com o HLA, a generalidade da população³⁴. A aplicação destas VST *off-the-shelf* é, principalmente, em doenças derivadas de infeções virais. O EBV está, muitas vezes, associado a alterações celulares e progressão de doenças, incluindo desordens linfoproliferativas²⁹. Com efeito, já foram obtidos resultados positivos em malignidades associadas ao EBV, nomeadamente, a doença linfoproliferativa pós-transplante em que se assistiu a uma baixa incidência de GVHD e elevadas taxas de resposta, o que ilustra o espaço de progressão que existe²³. O sucesso inicial verificado com a utilização de VST *off-the-shelf* - recorrendo a células T específicas com uma compatibilidade HLA mínima - foi, precisamente, consequência dos resultados obtidos no tratamento de doentes com um linfoma EBV-positivo decorrente de um transplante de um órgão sólido²⁹ ou de células hematopoiéticas alogénicas³⁴.

De salientar que as VST podem funcionar como uma plataforma celular suscetível de sofrer edição de genes. Neste seguimento, estas células podem ser reprogramadas geneticamente para expressar um CAR à sua superfície, o que confere uma capacidade efetora em novos alvos tumorais não virais através da especificidade do CAR e de mecanismos HLA-independentes. Por outro lado, também assistimos ao desenvolvimento de VSTs modificadas ao nível do TCR (via HLA-dependente), sendo que o objetivo é obter um TCR transgênico direcionado para um determinado tumor, que pode ser não viral. No que diz respeito a estas tecnologias, podem continuar a permitir um direcionamento para tumores virais, além de tumores não virais. Portanto, as VST podem ser direcionadas eficazmente quer por associação a um CAR, quer por alteração do TCR^{29,34}.

Atualmente, já podemos encontrar, a nível clínico, VSTs geneticamente modificadas, com origem alogénica em doadores saudáveis provenientes do banco de células previamente estabelecido, como por exemplo as **CAR⁺ EBVSTs** cujo alvo é o **CD30** em doentes com linfoma CD30+ derivado do EBV³⁴. Este é um dos exemplos em que, apesar da reprogramação genética ao nível do CAR, o alvo continuou a ser o tumor viral.

Apesar de serem suscetíveis de sofrer edição de genes, as VST são um exemplo de células T que garantem vantagens e fiabilidade na criação de terapias *off-the-shelf* sem manipulação genética²⁹. A demonstração de evidência quanto à atividade anti-tumoral destas células, bem como a ausência de GVHD, eleva as expectativas quanto ao futuro das terapias com VSTs *off-the-shelf*, sejam elas específicas para o EBV ou outros tipos de vírus²⁹.

2.5.2 Rejeição Células CAR-T alogénicas

Além do controlo necessário ao nível da GVHD, contornar a rejeição imune das células T revela-se uma problemática ainda mais complexa que exige a conjugação de várias armas do sistema imune do hospedeiro¹⁹. A rejeição das células T é o resultado da infusão de células alogénicas não compatíveis com o HLA das células T do doente, pelo que este vai encará-las como estranhas e rejeitar o transplante²⁸. A expansão e a persistência das células CAR-T são importantes para alcançar uma eficácia a curto e a longo prazo⁵³, sendo significativamente afetadas pelos domínios co-estimulatórios. Existem diferentes abordagens com a finalidade de permitir a expansão inicial das células e consequente melhoria da sua persistência após o controlo da GVHD: HLA-*matching*, reforço da linfodepleção, recurso a imunomoduladores e, por fim, deleção de HLA classe I e 2.

A **criação de um banco de células T** que correspondam à maioria da população em termos dos alelos de HLA - HLA *matching* - é a principal medida que permite evitar a rejeição

das células alogênicas CAR-T²⁹. Neste seguimento, considerando que os alelos mais importantes são o HLA-A, -B, -C e -DR, o tamanho do banco de células seria relativamente limitado, uma vez que apenas haveria correspondência para estes alelos o que seria suficiente para reduzir a rejeição de células CAR-T^{23,29}.

2.5.2.1 Expansão células CAR-T alogênicas

A proliferação inicial de células CAR-T necessária para alcançar uma proporção de células efetoras vs células alvo suficiente é um fator major para o sucesso desta imunoterapia, sendo que esta expansão das CAR-Ts pós-infusão está intimamente ligada com o sucesso da resposta terapêutica²³.

Para que se verifique uma expansão eficiente das células, é fundamental que exista uma quimioterapia linfopénica prévia - processo incluído na maioria dos protocolos de terapias CAR-T. A intensidade da linfodepleção existe um controlo rígido uma vez que, embora permita alcançar a depleção das células T reguladoras e uma melhor aceitação das células CAR-T infundidas, também pode levar a fenómenos de toxicidade como a Síndrome de Libertação de Citocinas (SLC), pelo que será imprescindível limitar a intensidade da quimioterapia. Posteriormente, as células administradas acabam por passar por um processo designado expansão homeostática após a sua transferência para o hospedeiro. Esta expansão é conduzida e impulsionada por citocinas homeostáticas como a IL-7 e IL-15, cujos níveis são superiores após a depleção linfocítica^{23,29}.

2.5.2.2 Persistência células CAR-T alogênicas

Uma frequente limitação da terapia com células alogênicas é a rápida eliminação do produto infundido pelo sistema imune do hospedeiro, pelo que as células do dador vão ter uma duração curta no novo meio em que foram inseridas. A rejeição imune das células infundidas pelo hospedeiro limitam a persistência das células *off-the-shelf* e, assim, comprometem a sua atividade anti-tumoral²³.

A duração ótima de persistência das células CAR-T difere consoante a doença em questão, o design do CAR ou a potência das células CAR-T administradas. Caso as células tumorais alvo estejam facilmente acessíveis às células efetoras, não será necessário que exista uma persistência de longo-termo após a eliminação das células tumorais. Todavia, a situação mais comum é as células tumorais alvo persistirem, o que induz a necessidade de um controlo de longo termo da doença. Assim sendo, pode ser necessário recorrer a administrações adicionais de células CAR-T para consolidar o tratamento e manter um número suficiente de

células efetoras no meio e, desta forma, eliminar células tumorais persistentes²³. Neste caso, existe a preocupação associada à toxicidade, uma vez que para cada administração de células CAR-T, vamos ter um depleção linfocítica associada, sendo que terá que haver um controlo da sua intensidade.

Outra forma de aumentar a persistência das CAR-Ts é, também, através do aumento da duração da linfopenia, sem que afete a atividade das células infundidas. Com base no referido, podemos inferir que esta abordagem acaba por ter imenso impacto tanto ao nível da expansão, como da persistência das células alogénicas. Todavia, esta é uma metodologia limitada a doentes criteriosamente selecionados e que abrange, apenas, cancros hematológicos e não tumores sólidos. Por fim, a opção por esta estratégia vai anular a anterior, uma vez que é de extrema dificuldade a repetição de linfodepleções intensas para a readministração de CAR-Ts.

3. Banco de células CAR-T

3.1 A importância da criação de um banco de células CAR-T

Torna-se imprescindível a criação de um banco de células CAR-T universais que permita uma utilização alogénica das mesmas, o que desencadearia uma **maior flexibilidade e rapidez na aplicação do produto final** aliada a uma **produção menos intensiva e dispendiosa**⁶⁰. A tecnologia CAR-T constitui um sistema inovador e uma oportunidade para os doentes que não podem ver as suas células T extraídas (devido ao seu estado já instalado de enfraquecimento do seu sistema imune), além das limitações associadas às células autólogas. A existência de células imunes saudáveis prontas a utilizar é crucial para aumentar a taxa de sucesso do tratamento dos doentes oncológicos⁶¹. De facto, é através do estabelecimento de um banco de células que se torna possível **evitarmos a rejeição das células CAR-T**, a **falta de persistência** das mesmas e o **aparecimento da GVHD**, fatores que se encontram na génese da problemática que envolve a tecnologia CAR-T. O objetivo final é, além de garantir a **disponibilidade imediata** de células CAR-T alogénicas, fazer com que sejam **o mais compatíveis possível** face ao extenso espectro de doentes, ou seja, compatíveis com os alelos HLA da maioria da população selecionada²³.

3.2 Estratégias para a obtenção de CAR-Ts universais

Tendo em consideração os expressivos aspetos acima mencionados e pormenorizados no Anexo I, as **medidas de prevenção das diferentes consequências** associadas a esta tecnologia devem ser encaradas como verdadeiras ferramentas para a criação de um banco de células, uma vez que abrem caminho para o desenvolvimento de diversos mecanismos que,

também, possibilitam a produção de células alogénicas universais prontas a administrar independentemente do tipo de HLA²⁴, o que fornece a possibilidade de gerar bancos de células com diferentes especificidades⁶². Desta forma, através da combinação do conhecimento desenvolvido referente às várias estratégias em estudo, considera-se possível atingir bibliotecas de células CAR-T efetivas, seguras e custo-efetivas⁶³.

Ainda assim, a **origem das células T** utilizadas no desenvolvimento das CAR-T deve ser outro aspeto a ter em consideração, uma vez que se verificam diferentes particularidades que podem ser diferenciadoras no sucesso do produto final, como veremos de seguida.

3.2.1 Origem das células T

Células CAR-T derivadas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Células de fácil e rápido acesso e com atividade clínica demonstrada. Atualmente, as CMSP de dadores saudáveis são as células T de referência e mais usadas para o desenvolvimento do produto CAR-T^{19,39}.

Células CAR-T derivadas de células estaminais pluripotentes induzidas (EPI)

Como hipótese para o estabelecimento de um banco universal de células CAR-T com diferentes tipos de HLA, surgem as células CAR-T EPI. As células T originárias de um dador saudável podem ser traduzidas com fatores reprogramadores, o que permite restaurar a sua pluripotência. De seguida, através da introdução da estrutura do CAR por meio de um vetor lentiviral, seria possível obter células CAR-T EPI capazes de se auto-renovarem. As células EPI têm capacidade ilimitada de se auto-renovarem e podem ser armazenadas num banco celular e ser usadas infinitamente. A possibilidade de aliar este sistema a pequenas edições genéticas como o *knock-out* do TRAC permitiria obter uma oferta contínua de células CAR-T universais.

O objetivo é estabelecer bibliotecas de células CAR-T prontas a utilizar, sempre que estas sejam necessárias, com o menor risco possível de GVHD ou alorejeição^{23,28}. Embora não existam ensaios clínicos, sabe-se que algumas das implicações desta tecnologia são a menor persistência das células CAR-T, bem como inferiores níveis de expressão do CAR²⁸.

Células CAR-T derivadas de sangue do cordão umbilical (SCU)

Apesar da sua segurança e eficácia ainda se encontrar em avaliação pré-clínica, são caracterizadas por permitirem uma utilização com baixa incidência e severidade de GVHD nos doentes, o que permite restrições menos rígidas na compatibilidade do HLA. As células T

derivadas do SCU têm um estado antigénio-*naive* único, o que pode estar relacionado com a baixa alorreatividade quando este tipo de células é transplantado^{19,23}.

3.3 A próxima geração de CAR-T

Prevê-se a contínua inovação e desenvolvimento da tecnologia CAR-T com a finalidade de alcançar aplicação prática e eficácia terapêutica. Neste sentido, e face aos desafios associados aos tumores sólidos, tornou-se imperativo desenvolver CARs mais funcionais e capazes de agir contra os mesmos:

4º geração de CAR-Ts (TRUCKs)

Na sequência das 3 gerações de CAR-Ts conhecidas e intensamente investigadas, surge a inovadora quarta geração de células, também denominadas por TRUCKs, em que estas têm a capacidade de desenvolver uma resposta assente na libertação de citocinas transgênicas que vão interferir com o perfil imunossupressor característico, principalmente, dos tumores sólidos. As citocinas pró-inflamatórias, idealmente, são depositadas num tecido alvo específico, o que permite aliviar efeitos adversos sistémicos que decorrem da administração do produto alogénico. Através da ambiciosa modificação das células CAR-T, para que estas adquiram a capacidade de secretar citocinas, poderá ser possível ultrapassar o microambiente tumoral imunossupressivo e, assim, aumentar a função anti-cancerígena, tanto das células CAR-T, como das células imunes residentes^{64,65}.

Quanto à estrutura do CAR, é baseado nos CARs de segunda geração, sendo que inclui uma proteína adicional, IL-12, expressa induzida ou constitutivamente. A ativação das células CAR-T por reconhecimento dos antígenos alvo vai promover a libertação desta citocina capaz de promover mecanismos sinérgicos que levam à morte tumoral.⁶⁶

A IL-12 libertada pelas TRUCKs apresenta uma atividade que incide na diferenciação das células T *naive* para o ramo das células TH1 envolvidas na imunoestimulação (enquanto o ramo das células TH2 são imunossupressivas), no aumento da citotoxicidade das células T e na expansão das células NK. As células TH1 e NK são responsáveis pela secreção de IFN- γ que, por sua vez, estimula a libertação de IL-12 através de macrófagos criando, assim, um *feedback* positivo de ativação imune em *loop*^{64,65}.

5º geração de CAR-Ts

A quinta geração, também designada por *next generation*, tem como base a estrutura dos CARs de segunda geração, tal como as TRUCKs. Embora ainda se encontre a ser estudada, é

conhecida a adição de um domínio de cadeia β intracelular correspondente ao recetor para a citocina IL-2 (IL-2R β) com um local de ligação para o fator de transcrição STAT3.⁶⁶

Neste caso, as células CAR-T, por reconhecimento do antígeno específico, induzem a ativação da via JAK-STAT que é responsável pela promoção da proliferação celular e prevenção da diferenciação terminal.¹⁷

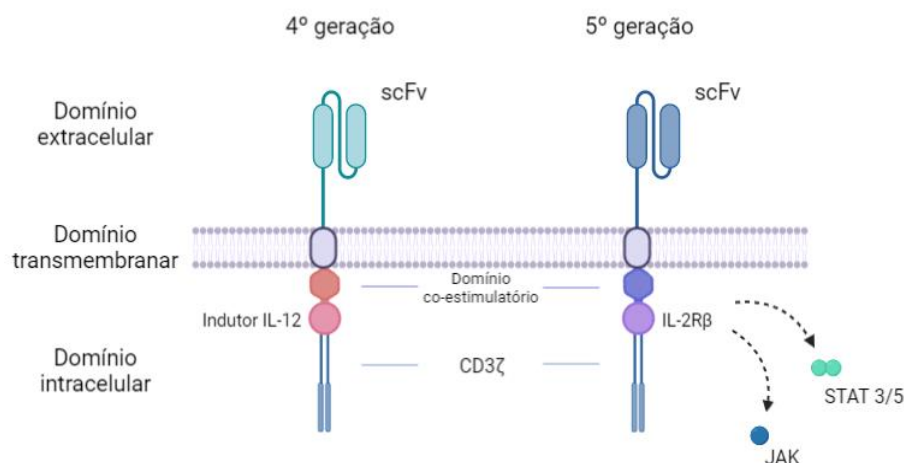


Figura 2. Comparação entre estrutura do CAR de 4º geração e 5º geração (Adaptado⁶⁶).

4. Panorama atual das células CAR-T

4.1 Evolução

Tem-se registado um crescente progresso na investigação de terapêuticas CAR-T, motivo pelo qual se gera, de forma exponencial, informação clínica relacionada com esta tecnologia. Desde o primeiro ensaio clínico com células CAR-T em 1998 até aos dias de hoje, podemos verificar esta evolução através das largas centenas de ensaios clínicos que estão a ser conduzidos por todo o mundo e pelos 5 produtos CAR-T, acima mencionados, já aprovados pela FDA^{67,68}. Atualmente, apenas um reduzido número de ensaios se encontram a decorrer, comparativamente à realidade CAR-T, o que demonstra o início da progressão neste âmbito⁶⁷.

No que diz respeito à análise da distribuição de ensaios a nível geográfico apresentada na Figura 3, é possível contemplar que a China se apresenta como a região com maior número de ensaios com células CAR-T, imediatamente seguida pelos Estados Unidos da América (EUA). Apesar da China ter ultrapassado os EUA no final de 2017, a grande maioria dos ensaios clínicos na China são realizados em pequenos grupos de doentes, pelo que os EUA apresentam resultados numa escala global bastante superior, tanto ao nível do número de doentes pertencentes à amostra como ao nível do número de centros de estudos.⁷⁰ A Europa e o Canadá surgem após as duas principais potências com um número considerável de ensaios.

Distribuição geográfica



Figura 3. Distribuição geográfica do número de ensaios em 2020 (Adaptado⁶⁹).

Numa outra perspetiva, analisando aquilo que são os principais intervenientes na inovação com células CAR-T alogénicas através da Figura 4, o domínio recai nas mesmas regiões onde existe um maior número de ensaios, sendo que, neste caso, a liderança tem lugar nos EUA e só depois na China.



Figura 4. Distribuição global de empresas com produtos CAR alogénicos (Adaptado⁷¹).

Com base na informação fornecida pelo Figura 5, datada de abril de 2020, é possível conferir o crescimento exponencial do número de ensaios com base na tecnologia CAR-T no ramo da oncologia.

Adicionalmente, é possível aferir que a situação pandémica derivada do vírus COVID-19 originou turbulência a nível global, pelo que se verifica uma redução abrupta no número de ensaios clínicos em 2020⁶⁹. Ainda assim, pequenos passos continuaram a ser dados no sentido de existir um contínuo desenvolvimento da tecnologia, o que se verifica pelos dois produtos recentemente aprovados pela FDA em 2021. Embora desafiante, 2020 evidenciou que o campo

da terapêutica celular continua em expansão e que a China se apresenta como um dos países com maior atividade neste ramo⁶⁹.

Crescimento do número de ensaios com células CAR-T

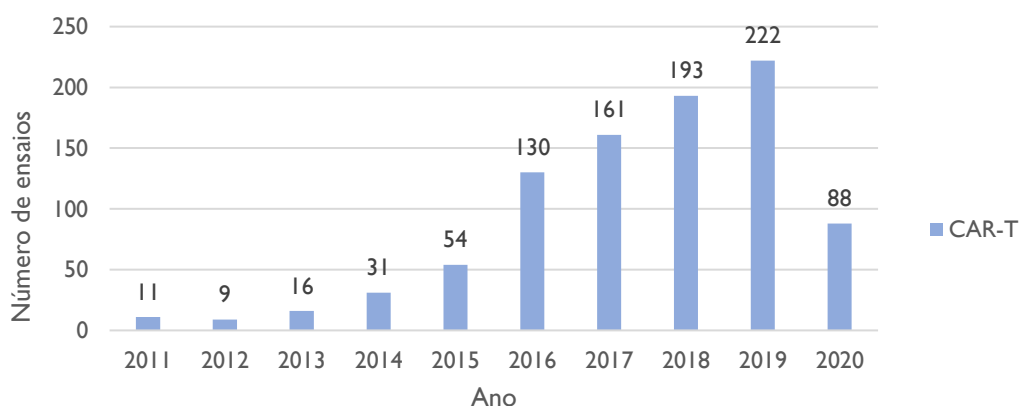


Figura 5. Número de ensaios desenvolvidos com células CAR-T em oncologia desde 2011 (Adaptado⁷¹).

CAR-Ts autólogas vs alogénicas

Considerando o período até junho de 2020, é possível observar pela Tabela I que existem, atualmente, mais de 900 ensaios em desenvolvimento com o objetivo de desenvolver terapêuticas CAR-T.

Tabela I. Número de tratamentos com células CAR-T.

Ensaios	Autólogas	Alogénicas	Desconhecidos	Total
Clínicos	388	61	272	721
Pré-clínicos	32	52	168	252
Total	420	113	440	973

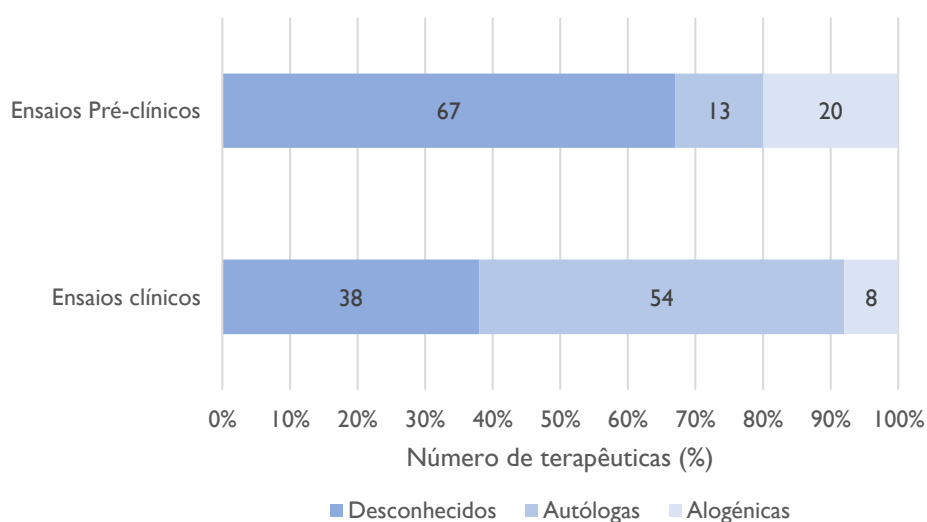


Figura 6. Número de terapêuticas, em percentagem, por estado de investigação (Adaptado⁷¹).

É possível apurar que, gradualmente, a abordagem alogénica tem vindo a ganhar força e solidez na *pipeline* dos grandes intervenientes das terapias celulares. Através da análise da Figura 6, conclui-se que as células alogénicas já apresentam uma maior expressão naquilo que é a investigação pré-clínica atual⁶⁹. Todavia, ainda existe uma predominância das terapêuticas autólogas no espaço clínico, o que se deve à maturidade dos estudos e conclusões existentes relativas a esta vertente⁷¹. Embora estejamos perante um grande número de ensaios de categorização desconhecida, a tendência que se verifica é de crescimento da abordagem alogénica devido às diversas vantagens acima mencionadas.

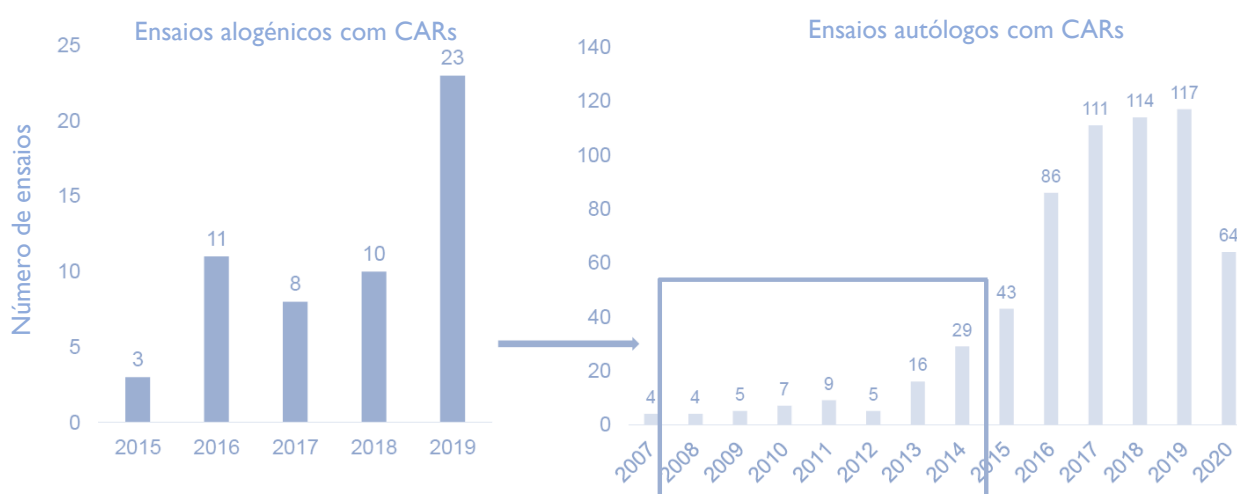


Figura 7 e 8. Comparação entre o atual número de ensaios alogénicos vs ensaios autólogos entre 2008-2014 (Adaptado)⁷¹.

Como é possível concluir através da comparação estabelecida nas Figuras 7 e 8, assistimos a um período análogo ao que se verificou com as células autólogas nos primeiros anos, aquando do seu surgimento e aprofundamento clínico. Daí que a expectativa para o futuro das células alogénicas seja bastante promissor e exponencial, tal como aconteceu com as células autólogas. Aliando este panorama a todas as evoluções adjacentes a que assistimos ao nível das diferentes estruturas do CAR, das diferentes modificações genéticas e das diferentes alternativas para ultrapassar as limitações que enfrentamos atualmente, espera-se que o futuro das células CAR-T alogénicas seja extremamente positivo.

Edição de genes

Atualmente, existem cerca de 25 terapêuticas alogénicas em desenvolvimento, com base na estrutura do CAR, que recorrem a edição de genes. Sendo que alguns destes produtos são estratégias específicas de determinadas empresas, cada vez são mais os *players* com tecnologias inovadoras desenvolvidas para ultrapassar as limitações existentes das células CAR-T.

No que concerne às diferentes alternativas de edição genética, o conjunto CRISPR/Cas9 e o sistema TALEN acabam por ser as abordagens com maior expressão dentro da edição de genes, de acordo com o Figura 9, para ultrapassar uma das principais complicações associadas à tecnologia CAR-T: GVHD.

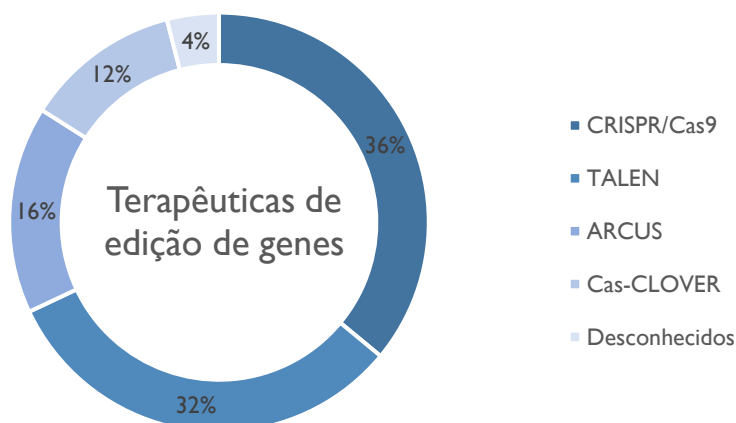


Figura 9. Expressão, em percentagem, das várias terapêuticas de edição de genes (Adaptado)⁷¹.

4.2 Ensaios clínicos

Desde a aprovação do primeiro produto CAR-T em 2017, tem-se verificado um aumento exponencial de ensaios clínicos que contribuem com grande impacto para a rápida evolução a que assistimos. Embora em 2012 apenas existissem 12 ensaios clínicos *on-going*, hoje em dia o número já ultrapassa os 500, sendo que cerca de 75% destes dizem respeito à abordagem autóloga. Atualmente, a terapêutica com células CAR-T regista cinco produtos aprovados, acima referidos, o que comprova o futuro promissor desta tecnologia⁷².

Desta forma, os principais ensaios clínicos existentes são indissociáveis de grandes empresas farmacêuticas que operam estrategicamente com o intuito de originar produtos cada vez mais inovadores. De seguida, seguem-se algumas das empresas que se encontram na vanguarda da tecnologia CAR-T e os ensaios clínicos que se encontram a decorrer atualmente.

Allogene Therapeutics

A Allogene Therapeutics está comprometida com o desenvolvimento de terapêuticas **AlloCAR T™**, isto é, terapêuticas com base em células CAR-T alogénicas que se encontram armazenadas *off-the-shelf*, o que permite potenciar o acesso à terapêutica, a redução do seu custo, a rapidez de oferta e a otimização do produto final⁷³.

Tabela 2. Pipeline da Allogene Therapeutics⁷⁴.

Produto	Alvo	ID Ensaio	Estado do ensaio	Doença em estudo	Tipo malignidade	Fonte de células
ALLO-501	CD19	NCT03939026	Fase I	Linfoma não hodgkin r/r	Hematológica	Alogénica
ALLO-501A	CD19	NCT04416984	Fase I/2	Linfoma não hodgkin r/r	Hematológica	Alogénica
ALLO-715	BCMA	NCT04093596	Fase I	Mieloma múltiplo r/r	Hematológica	Alogénica
ALLO-715 + nirogacestat	BCMA	NCT04093596	Fase I	Mieloma múltiplo r/r	Hematológica	Alogénica
ALLO-316	CD70	NCT04696731	Fase I	Carcinoma células renais	Tumor Sólido	Alogénica

Cellectics

Biofarmacêutica cuja *pipeline* consiste em células CAR-T universais (**UCART**), isto é, produtos alogénicos *off-the-shelf* que representam uma mudança de paradigma ao nível da acessibilidade e disponibilidade. Cada produto UCART tem como alvo um determinado antígeno tumoral e encara um desenvolvimento associado a uma plataforma de edição de genes **TALEN**[®] que vai intervir através da alteração ou remoção de genes específicos⁷⁵. Os UCART podem, desta forma, ser administrados a qualquer doente, independentemente da sua compatibilidade com o sistema HLA⁷⁶.

Tabela 3. Pipeline da Cellectics⁷⁵.

Produto	Alvo	ID Ensaio	Estado do ensaio	Doença em estudo	Tipo malignidade	Fonte de células
UCART123	CD123	NCT03190278	Fase I	LMA	Hematológica	Alogénica
UCART22	CD22	NCT04150497	Fase I	B-LLA r/r	Hematológica	Alogénica
UCARTCSI	CS1/SLAMF7	NCT04142619	Fase I	MM r/r	Hematológica	Alogénica
UCART19	CD19	NCT02808442	Fase I	LLA r/r	Hematológica	Alogénica

Celyad Oncology

Tem como objetivo a construção de um portfólio diversificado de candidatos CAR-T autólogos e alogénicos para o tratamento de cancro hematológicos, bem como tumores sólidos. Através da metodologia **all-in-one vector**, a Celyad consegue simplificar o *design* e o processo de desenvolvimento dos seus produtos. Esta abordagem que envolve uma única transdução permite otimizar os passos de fabrico e desenvolvimento enquanto amplia o potencial de aplicabilidade da sua *pipeline*⁷⁷.

Tabela 4. Pipeline da Celyad Oncology⁷⁸.

Produto	Alvo	ID Ensaio	Estado do ensaio	Doença em estudo	Tipo malignidade	Fonte de células
CYAD-101	NKG2DL	NCT03692429	Fase I	CCRm r/r	Tumor sólido	Alogénica
CYAD-103	NKG2DL	NA	Pré-clínica	Tumores sólidos	Tumor sólido	Alogénica
CYAD-211	BCMA	NCT04613557	Fase I	MM r/r	Hematológica	Alogénica
CYAD-02	NKG2DL	NCT04167696	Fase I	LMA & SMD r/r	Hematológica	Autóloga

Fate Therapeutics, Inc.

Os candidatos pertencentes à pipeline da Fate Therapeutics, Inc. incluem imunoterapias celulares de primeira linha para doenças oncológicas e imunológicas. Através da utilização de **células estaminais pluripotentes induzidas**, o objetivo é alcançar linhagens celulares geneticamente modificadas com propriedades biológicas específicas. Desta forma, através de uma fonte renovável de células, pretende-se obter células *off-the-shelf* através de uma produção custo-efetiva, rápida e bem definida. Além das células **CAR-T**, também as células **CAR-NK** fazem parte dos produtos candidatos, o que permite ter ação terapêutica numa ampla gama de tumores sólidos e câncros hematológicos⁷⁹.

Tabela 5. Pipeline da Fate Therapeutics, Inc.⁸⁰.

Produto	Alvo	ID Ensaio	Estado do ensaio	Doença em estudo	Tipo malignidade	Fonte de células
FT 596	CD19, CD20	NCT04245722	Fase I	Linfoma avançado de células B & LLC	Hematológica	Alogénica
FT 576	BCMA, CD38	NA	Pré-clínica	MM	Hematológica	Alogénica
FT 536	MICA/B	NA	Pré-clínica	Tumores sólidos	Tumor sólido	Alogénica

A par da Celyad Oncology, a Fate Therapeutics, Inc. focou o seu interesse no desenvolvimento de terapêuticas celulares baseadas em células NK com o objetivo final de ultrapassar os desafios de persistência e consequente falta de eficácia existentes nas alternativas de tratamento disponíveis. Nomeadamente, os principais produtos em estudo por estas indústrias são o FT596 pela Fate Therapeutics, Inc. - células CAR-NK alogénicas - e os produtos autólogos CYAD-01 e CYAD-02 e alogénicos CYAD-101 da Celyad Oncology. De facto, estes produtos garantem a possibilidade de redosagem, o que poderá permitir o aumento da expansão e persistência dos produtos alogénicos⁸¹.

5. O grande desafio do futuro

O campo da terapêutica celular CAR-T mostra significativos avanços comprovados pelo crescimento inegável da evidência gerada pelos diversos estudos em desenvolvimento. Embora cada vez mais se comprove a eficácia desta estratégia, urge melhorar a sua efetividade e acelerar o seu processo logístico para o mais curto intervalo de tempo²⁴. As células CAR-T alteraram a perspectiva atual no que diz respeito ao tratamento de câncros hematológicos, estabelecendo-se como uma das abordagens mais promissoras na terapêutica cancerígena²³. O desenvolvimento de **células universais *off-the-shelf*** revela-se como a chave do sucesso desta tecnologia, uma vez que é a partir delas que será possível ter um produto final rapidamente disponível ou ter acesso a um tratamento com um custo significativamente reduzido, obstáculos que permitirão desbloquear o acesso a esta classe terapêutica a um maior número de doentes. Através das diferentes estratégias de edição genética ou da utilização de específicas populações celulares, tornou-se possível ultrapassar limitações anteriores como, por exemplo, a GVHD ou mesmo a persistência e expansão das células alogénicas^{16,23}.

Apesar de todos os avanços já alcançados, vários desafios continuam por responder até ser possível maximizar o potencial desta estratégia terapêutica. Alguns dos obstáculos por ultrapassar dizem respeito aos **tumores sólidos**. De facto, os resultados de células CAR-T em tumores sólidos mostram-se pouco satisfatórios face à realidade hematológica, pelo que serão necessárias células cada vez mais robustas, otimizadas e resistentes para ultrapassar o microambiente tumoral deste tipo de malignidades. Além dos tumores sólidos, eleva-se a necessidade de criar tratamentos para os **diferentes tipos de câncros** humanos, o que exige a otimização de CARs para diversos antígenos específicos. Por fim, manter a preocupação de tornar as terapêuticas o menos custo-proibitivas possível, de forma a **garantir o acesso** a toda a população⁸².

Concluindo, as células CAR-T *off-the-shelf* estão a **revolucionar o tratamento oncológico**, o que justifica o contínuo esforço feito por inúmeras empresas farmacêuticas, biotecnológicas e grupos académicos. Considerando o progresso exponencial a que se assistiu nos últimos anos, é imperativo ser otimista quanto ao futuro desta tecnologia, uma vez que as principais provas que as células CAR-T podem ser uma mais valia, já foram dadas.

Referências Bibliográficas

1. SCHAFT, N. - *The landscape of car-t cell clinical trials against solid tumors - a comprehensive overview*. *Cancers (Basel)*. 12, (2020) 1-36.
2. ELAHI, R., KHOSH, E., TAHMASEBI, S. & ESMAEILZADEH, A. - *Immune Cell Hacking: Challenges and Clinical Approaches to Create Smarter Generations of Chimeric Antigen Receptor T Cells*. *Front. Immunol.* 9, (2018) 1-18.
3. FDA - FDA approval brings first gene therapy to the United States. 2017. [Consult. 7 mar. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states>
4. FDA - FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma. 2017. [Consult. 7 mar. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-car-t-cell-therapy-treat-adults-certain-types-large-b-cell-lymphoma>
5. FDA - FDA approves brexucabtagene autoleucel for relapsed or refractory mantle cell lymphoma. 2020. [Consult. 7 mar. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-brexucabtagene-autoleucel-relapsed-or-refractory-mantle-cell-lymphoma>
6. MULLARD, A. - **FDA approves fourth CAR-T cell therapy**. *Nature Reviews Drug Discovery* 20, 166 (2021) [Consult. 7 mar. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.nature.com/articles/d41573-021-00031-9>
7. FDA - BREYANZI (lisocabtagene maraleucel). 2021. [Consult. 7 mar. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/breyanzi-lisocabtagene-maraleucel>
8. MULLARD, A. - **FDA approves first BCMA-targeted CAR-T cell therapy**. *Nature Reviews Drug Discovery* 20, 332 (2021). [Consult. 28 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.nature.com/articles/d41573-021-00063-1>
9. NATIONAL CANCER INSTITUTE - FDA Approves BCMA-Targeted CAR T-Cell Therapy for Multiple Myeloma. 2021. [Consult. 28 abr. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2021/fda-ide-cel-car-t-multiple-myeloma>
10. RAJE, N., BERDEJA, J., LIN, Y., SIEGEL, D., JAGANNATH, S., MADDURI, D., LIEDTKE, M., ROSENBLATT, J., MAUS, M., TURKA, A., LAM, L., MORGAN, R., FRIEDMAN, K.,

- MASSARO, M., WANG, J., RUSSOTTI, G., YANG, Z., CAMPBELL, T., HEGE, K., PETROCCA, F., QUIGLEY, T., MUNSHI, N. & KOCHENDERFER, J. - **Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma**. *The new england journal of medicine* 380 (2019) 1726-1737.
11. MIRZAEI, H. R., RODRIGUEZ, A., SHEPPHARD, J., BROWN, C. E. & BADIE, B. - **Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: Challenges and clinical applications**. *Frontiers in Immunology* 8 (2017) 1-13.
 12. ZHANG, E. & XU, H. - **A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy**. *Journal of Hematol. & Oncol.* 10 (2017) 1-11.
 13. ZHAO, Z., CHEN, Y., FRANCISCO, N. M., ZHANG, Y. & WU, M. - **The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges**. *Acta Pharm. Sinica B* 8, (2018) 539-551.
 14. HUANG, R., LI, X., HE, Y., ZHU, W., GAO, L., LIU, Y., GAO, L., WEN, Q., ZHONG, J. F., ZHANG, C. & ZHANG, X. - **Recent advances in CAR-T cell engineering**. *Journal of Hematol. & Oncol.* 13, (2020) 1-19.
 15. ZHANG, Q., PING, J., HUANG, Z., ZHANG, X., ZHOU, J., WANG, G., LIU, S. & MA, J. - **CAR-T Cell Therapy in Cancer: Tribulations and Road Ahead**. *Journal of Immunol. Research* 2020, (2020) 1-11.
 16. HARTMANN, J., SCHÜBLER-LENZ, M., BONDANZA, A. & BUCHHOLZ, C. J. - **Clinical development of CAR T cells - challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts**. *EMBO Mol. Med.* 9, (2017) 1183-1197.
 17. KIM, D. W. & CHO, J. Y. - **Recent advances in allogeneic CAR-T cells**. *Biomolecules* 10, (2020) 1-15.
 18. WANG, X. & RIVIÈRE, I. - **Clinical manufacturing of CAR T cells: Foundation of a promising therapy**. *Mol. Ther. - Oncolytics* 3, 16015 (2016) 1-7.
 19. MO, F., MAMONKIN, M., BRENNER, M. K. & HESLOP, H. E. - **Taking T-Cell Oncotherapy Off-the-Shelf**. *Trends in Immunol.* 42, (2021) 261-272.
 20. STANTON, D. - **Cost of Goods Is Crucial for the Future of Regenerative Medicine CAR-T Cell Therapy Provides a Case Study in Perspective**. *Bioprocess Int.* 17 (2019).
 21. O'BRIEN, S. - **Advances in LLM**. *Clinical Advances in Hematology & Oncology* 17 (2019) 155-157.

22. LEVINE, B. L., MISKIN, J., WONNACOTT, K. & KEIR, C. - **Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy**. *Mol. Ther. - Methods & Clin. Development* 4 (2017) 92-101.
23. DEPIL, S., DUCHATEAU, P., GRUPP, S. A., MUFTI, G. & POIROT, L. - **"Off-the-shelf" allogeneic CAR T cells: development and challenges**. *Nature Reviews Drug Discov.* 19 (2020) 185-199.
24. BENJAMIN, R. - **CAR T cells - the future for cancer therapy**. *Medicine Journal (United Kingdom)*. 49 (2021) 10-12.
25. DATE, V. & NAIR, S. - **Emerging vistas in CAR T-cell therapy: challenges and opportunities in solid tumors**. *Expert Opin. Biol. Ther.* 21 (2020) 145-160.
26. VORMITTAG, P., GUNN, R., GHORASHIAN, S. & VERAITCH, F. S. - **A guide to manufacturing CAR T cell therapies**. *Current Opinion in Biotechnol.* 53 (2018) 164-181.
27. STRONCEK, D. F., LEE, D. W., REN, J., SABATINO, M., HIGHFILL, S., KHUU, H., SHAH, N. N., KAPLAN, R. N., FRY, T. J. & MACKALL, C. L. - **Elutriated lymphocytes for manufacturing chimeric antigen receptor T cells**. *Journal of Translational Medicine* 15 (2017) 1-8.
28. GRAHAM, C., JOZWIK, A., PEPPER, A. & BENJAMIN, R. - **Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access?**. *Cells* 7, 155 (2018) 1-11.
29. AFTAB, B. T., SASU, B., KRISHNAMURTHY, J., GSCHWENG, E., ALCAZER, V. & DEPIL, S. - **Toward "off-the-shelf" allogeneic CAR T cells**. *Adv. in Cell and Gene Therapy* 3 (2020) 1-11.
30. WADE, H. - **Are Allogeneic CAR Therapies the Way Forward?**. *Beacon Targeted Therapies*. 2020. [Consult. 28 maio 2021]. Disponível na Internet: www.beacon-intelligence.com
31. ANBAR, M. - **The future of cell-based immunotherapy: autologous vs allogeneic treatment**. *Horizon Discovery*. 2020. [Consult. 28 maio 2021] Disponível na Internet: <https://horizondiscovery.com/en/blog/the-future-of-cell-based-immunotherapy>
32. NATURE - MHC. [Consult. 28 maio 2021] Disponível na Internet: <https://www.nature.com/subjects/mhc>
33. FELIX, N. J. & ALLEN, P. M. - **Specificity of T-cell alloreactivity**. *Nature Rev. Immunol.* 7 (2007) 942-953.
34. PEREZ, C., GRUBER, I. & ARBER, C. - **Off-the-Shelf Allogeneic T Cell Therapies for Cancer: Opportunities and Challenges Using Naturally Occurring "Universal"**

- Donor T Cells.** *Front. in Immunol.* 11, (2020) 1-16.
35. ZHAO, L. & CAO, Y. J. - **Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic.** *Frontiers in Immunology* vol. 10 (2019) 1-20.
 36. KABELITZ, D., SERRANO, R., KOUAKANOU, L., PETERS, C. & KALYAN, S. - **Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us.** *Cell. & Mol. Immunol.* 17 (2020) 925-939.
 37. HEINE, A. & BROSSART, P. - **A party of three: iNKT cells in GVHD prevention.** *Thromb. Haemost.* 113 (2015) 943-951.
 38. GRAUBERT, T. A., DIPERSIO, J. F., RUSSELL, J. H. & LEY, T. J. - **Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation.** *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 904-911.
 39. MARTÍNEZ BEDOYA, D., DUTOIT, V. & MIGLIORINI, D. - **Allogeneic CAR T Cells: An Alternative to Overcome Challenges of CAR T Cell Therapy in Glioblastoma.** *Front. Immunol.* 12 (2021) 1-20.
 40. LIU, J., ZHOU, G., ZHANG, L. & ZHAO, Q. - **Building potent chimeric antigen receptor T cells with CRISPR genome editing.** *Front. in Immunol.* 10, (2019) 1-8.
 41. LI, C., MEI, H. & HU, Y. - **Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy.** *Brief. Funct. Genomics* 19, (2020) 175-182.
 42. ALZUBI, J., LOCK, D., RHIEL, M., SCHMITZ, S., WILD, S., MUSSOLINO, C., HILDENBEUTEL, M., BRANDES, C., ROSITZKA, J., LENNARTZ, S., HAAS, S. A., CHMIELEWSKI, K. O., SCHASER, T., KAISER, A., CATHOMEN, T. & CORNU, T. - **Automated generation of gene-edited CAR T cells at clinical scale.** *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* 20 (2021) 379-388.
 43. ZHAO, J., LIN, Q., SONG, Y. & LIU, D. - **Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells.** *J. Hematol. Oncol.* 11 (2018) 25-29.
 44. PRECISION BIOSCIENCES - ARCUS Genome Editing. 2019. [Consult. 28 maio 2021] Disponível na Internet: <https://precisionbiosciences.com/our-approach/arcus-genome-editing/>
 45. COHRT, K. O. - Latest Gene Editing Clinical Trials for Cancer. CRISPR Medicine. 2020. [Consult. 28 maio 2021] Disponível na Internet: <https://crisprmedicineneeds.com/news/>

46. LI, X., WANG, X., TONG, M., TAN, Y., DOWN, J. D., SHEDLOCK, D. J. & OSTERTAG, E. M. - **Cas-CLOVER™: A High-Fidelity Genome Editing System for Safe and Efficient Modification of Cells for Immunotherapy.** Poseida Therapeutics, Inc.. (2019).
47. CHAKRABORTY, T. - Cas - CLOVER: A New Dawn in Genome Editing Technology - GeneOnline. 2020. [Consult. 6 jun. 2021] Disponível na Internet: <https://geneonline.news/en/cas-clover-a-new-dawn-in-genome-editing-technology/>
48. LISZEWSKI, K. - **True CRISPR: A Genetic Genre with Novel Twists.** Genet. Eng. Biotechnol. News 38 (2018).
49. SINGH, N., SHI, J., JUNE, C. H. & RUELLA, M. - **Genome-editing technologies in adoptive T cell immunotherapy for cancer.** Curr Hematol Malig Rep. 12 (2017) 522-529.
50. SATHER, B. D., IBARRA, G. S. R., SOMMER, K., CURINGA, G., HALE, M., KHAN, I. F., SINGH, S., SONG, Y., GWIAZDA, K., SAHNI, J., JARJOUR, J., ASTRAKHAN, A., WAGNER, T. A., SCHARENBERG, A. M. & RAWLINGS, D. J. - **Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template.** Sci. Transl. Med. 7 (2015) 1-29.
51. BOISSEL, S., JARJOUR, J., ASTRAKHAN, A., ADEY, A., GOUBLE, A., DUCHATEAU, P., SHENDURE, J., STODDARD, B. L., CERTO, M. T., BAKER, D. & SCHARENBERG, A. M. - **MegaTALs: A rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering.** Nucleic Acids Res. 42 (2014) 2591-2601.
52. KAMIYA, T., WONG, D., PNG, Y. T. & CAMPANA, D. - **A novel method to generate T-cell receptor-deficient chimeric antigen receptor T cells.** Blood Adv. 2 (2018) 517-528.
53. CALDWELL, K. J., GOTTSCHALK, S. & TALLEUR, A. C. - **Allogeneic CAR Cell Therapy—More Than a Pipe Dream.** Front. in Immunol. 11 (2021) 1-12.
54. PATEL, S., CRUZ, C. R. Y., BURGA, R. A., POWELL, A. B., CHORVINSKY, E. W., HOQ, N., McCORMACK, S. E., VAN PERT, S. N. & HANLEY, P. J. - **Beyond CAR T cells: Other cell-based immunotherapeutic strategies against cancer.** Frontiers in Oncology 9 (2019) 1-71.
55. ROZENBAUM, M., MEIR, A., AHARONY, Y., ITZHAKI, O., SCHACHTER, J., BANK,

- I., JACOBY, E. & BESSER, M. J. - **Gamma-Delta CAR-T Cells Show CAR-Directed and Independent Activity Against Leukemia.** *Front. Immunol.* 11 (2020) 1-8.
56. CONSONNI, M., DE LALLA, C., BIGI, A., DELLABONA, P. & CASORATI, G. - **Harnessing the CDI restricted T cell response for leukemia adoptive immunotherapy.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 36 (2017) 117-123.
57. CONSONNI, M., DELLABONA, P. & CASORATI, G. - **Potential advantages of CDI-restricted T cell immunotherapy in cancer.** *Mol. Immunol.* 103 (2018) 200-208.
58. Leen, A. M., BOLLARD, C. M., MENDIZABAL, A. M., SHPALL, E. J., SZABOLCS, P., ANTIN, J. H., KAPOOR, N., PAI, S., ROWLEY, S. D., KEBRIAEI, P., DEY, B. R., GRILLEY, B. J., GEE, A. P., BRENNER, M. K., ROONEY, C. M. & HESLOP, H. E. - **Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation.** *Blood* 121 (2013) 5113-5123.
59. RICHARD J. O'REILLY, PROCKOP, S., HASAN, A. N., KOEHNE G., DOUBROVINA, E. - **Virus-Specific T-Cell Banks for "Off The Shelf" Adoptive Therapy of Refractory Infections.** *Physiol. Behav.* 63 (2014) 1-18.
60. TEOH, P. J. & CHNG, W. J. - **CAR T-cell therapy in multiple myeloma: more room for improvement.** *Blood Cancer J.* 11 (2021) 1-18.
61. HILDRETH, C. - Is Storing Your Immune Cells Really Worth It?. *BiInformant.* 2020. [Consult. 17 jun. 2021] Disponível na Internet: <https://bioinformant.com/immune-cell-banking/>
62. GEORGIADIS, C., RASAIYAAH, J., GKAZI, S. A., PREECE, R., ETUK, A., CHRISTI, A. & QASIM, W. - **Base-edited CAR T cells for combinational therapy against T cell malignancies.** *Leukemia* (2021) 1-16.
63. BRODSKY A. N. - The Promise of CAR T Cell Therapy in 2019 and Beyond - Cancer Research Institute. 2019. [Consult. 16 jun. 2021] Disponível na Internet: <https://www.cancerresearch.org/blog/september-2019/promise-car-t-cell-therapy-2019-beyond>
64. CHMIELEWSKI, M. & ABKEN, H. - **TRUCKS, the fourth-generation CAR T cells: Current developments and clinical translation.** *Adv. Cell Gene Ther.* 3 (2020) 1-9.
65. HAWKINS, E. R., D'SOUZA, R. R. & KLAMPATSA, A. - **Armored CAR T-cells: The next chapter in T-cell cancer immunotherapy.** *Biol. Targets Ther.* 15 (2021) 95-105.

66. TOKAREW, N., OGONEK, J., ENDRES, S., VON BERGWELT-BAILDON, M. & KOBOLD, S. - **Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells.** *Br. J. Cancer* 120 (2019) 26-37.
67. ALBINGER, N., HARTMANN, J. & ULLRICH, E. - **Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany.** *Gene Ther.* (2021) 1-15.
68. MORENO-CORTES, E., FORERO-FORERO, J. V., LENGERKE-DIAZ, P. A. & CASTRO, J. E. - **Chimeric antigen receptor T cell therapy in oncology - Pipeline at a glance: Analysis of the ClinicalTrials.gov database.** *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 159 (2021) 1-10.
69. BEACON TARGETED THERAPIES - Car-TCR Landscape: 2020 in Review. 2020. [Consult. 28 maio 2021] Disponível na Internet: <https://beacon-intelligence.com/adoptive-cell-infographic-feb-2021>
70. GOU, L., GAO, J., YANG, H. & GAO, C. - **The landscape of CAR T-cell therapy in the United States and China: A comparative analysis.** *Int. J. Cancer* 144 (2019) 2043-2050.
71. WADE, H. - Are Allogeneic CAR Therapies the Way Forward?. Beacon Targeted Therapies. 2020. [Consult. 28 maio 2021] Disponível na Internet: <https://beacon-intelligence.com/>
72. **Global CAR-T Cell Therapy Market - Market Size, Forecasts, Trials & Trends.** Global: BioInformant, 2021.
73. ALLOGENE THERAPEUTICS - AlloCAR T Therapy developed by Allogene Therapeutics. 2020. [Consult. 15 jul. 2021] Disponível na Internet: <https://www.allogene.com/allocar-t-therapy>
74. ALLOGENE THERAPEUTICS - The Product Pipeline of Allogene Therapeutics. 2020. [Consult. 15 jul. 2021] Disponível na Internet: <https://www.allogene.com/pipeline#all0-501>
75. CELLECTIS - Main Product Candidates. 2021. [Consult. 15 jul. 2021] Disponível na Internet: <https://www.cellectis.com/en/products/product-candidates/>
76. BRENTJENS, R. J., RIVIÈRE, I., PARK, J. H., DAVILA, M. L., WANG, X., STEFANSKI, J., TAYLOR, C., YEH, R., BARTIDO, S., BORQUEZ-OJEDA, O., OLSZEWSKA, M., BERNAL, Y., PEGRAM, H., PRZYBYŁOWSKI, M., HOLLYMAN, D., USACHENKO, Y., PIRRAGLIA, D., HOSEY, J., SANTOS, E., HALTON, E., MASLAK, P., SCHEINBERG, D.,

- JURCIC, J., HEANEY, M., HELLER, G., FRATTINI, M. & SADELAIN, M. - ***Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias.*** *Blood* 118, (2011) 4817-4828.
77. CELYAD - All-In-One Vector - Celyad Oncology. 2020. [Consult. 15 jul. 2021] Disponível na Internet: <https://celyad.com/our-science-technology/all-in-one-vector/>
78. CELYAD - Pipeline - Celyad Oncology. 2020. [Consult. 15 jul. 2021] Disponível na Internet: <https://celyad.com/our-pipeline/>
79. FATE THERAPEUTICS - Our Mission. 2021. [Consult. 15 jul. 2021] Disponível na Internet: <https://fatetherapeutics.com/about-us/our-mission/>
80. FATE THERAPEUTICS - Pipeline. 2021. [Consult. 15 jul. 2021] Disponível na Internet: <https://fatetherapeutics.com/pipeline/>
81. PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY - Fate Therapeutics' and Celyad's CAR therapies in oncology offer potential. 2020. [Consult. 15 jul. 2021] Disponível na Internet: <https://www.pharmaceutical-technology.com/comment/fate-therapeutics-celyad-car-therapies/>
82. AHMAD, A. - CAR-T Cell Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (2020) 19-21.

Anexo

Anexo I. Abordagens para a obtenção de produtos CAR-T universais.

Abordagens	Tecnologia	Características	Ref.	
Com modificação genoma				
Edição de genes	Remoção TCR	<i>Knock-out</i> (TRAC, TRBC, CD3 ζ) <i>Knock-in</i> (CAR)	19 19	
	Sistema CRISPR/Cas9	<i>Knock-out</i> (MHC, TCR)	23, 40, 41	
	TALEN	<i>Knock-out</i> (TCR, CD52)	23, 29, 42, 43	
	ARCUS	<i>Knock-out</i> <i>Knock-in</i>	44, 45	
	Cas-CLOVER	<i>Knock-out</i>	46, 47, 48	
	Nucleases de Dedo de Zinco	<i>Knock-out</i>	23, 49	
	MegaTAL	<i>Knock-out</i>	50, 51	
	Inibição do TCR	BEPs MITs	19, 52	
	Sem modificação genoma			
	Células T universais	Células NK	Efeito <i>graft-versus-tumor</i>	23, 53
Células T $\gamma\delta$		Reconhecimento de alvos de forma MHC-independente	23, 34, 36, 53, 54, 55	
Células T CDI (lipído)-restritas		Moléculas CDI apresentadoras de antígeno não polimórficas	23, 34, 37, 56, 57	
Células T de memória vírus-específicas	-	Reportório restrito e pouco diversificado	23, 29, 34, 39, 58, 59	
Células CAR-T alogénicas derivadas de dador de transplante de células estaminais	-	Elevado grau de semelhança entre o HLA do doente e do dador	23, 28	
Origem das células T	CMSP	Fácil e rápido acesso	19, 39	
	EPI	Capacidade ilimitada de autorrenovação	23, 28	
	SCU	Baixa incidência e severidade de GVHD	19, 23	