

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Pedro Henrique Dias Moura Prazeres

**Plataforma de Nanopartículas Lipídicas Ionizáveis Visando Imunoterapia do
Câncer**

Belo Horizonte

2024

Pedro Henrique Dias Moura Prazeres

**Plataforma de Nanopartículas Lipídicas Ionizáveis Visando Imunoterapia do
Câncer**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia – área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Pedro Pires Goulart Guimarães

Coorientadora: Helen Lima Del Puerto

Belo Horizonte

2024

043

Prazeres, Pedro Henrique Dias Moura.

Plataforma de nanopartículas lipídicas ionizáveis visando imunoterapia do câncer
[manuscrito] / Pedro Henrique Dias Moura Prazeres. – 2024.

149 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Pedro Pires Goulart Guimarães. Coorientador: Helen Lima Del Puerto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Nanopartículas. 3. Ácidos Nucleicos. 4. Linfócitos T. 5. Vacinas. 6.
Imunoterapia. I. Guimarães, Pedro Pires Goulart. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

PEDRO HENRIQUE DIAS MOURA PRAZERES

"Plataforma de Nanopartículas Lipídicas Ionizáveis Visando Imunoterapia do Câncer"

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 27 de março de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho, FIOCRUZ/MG

Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, USP

Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frezard, ICB/UFMG

Prof. Dr. Helton da Costa Santiago, ICB/UFMG

Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto, ICB/UFMG - COORIENTADORA

Prof. Dr. Pedro Pires Goulart Guimarães, ICB/UFMG - ORIENTADOR

Belo Horizonte, 27 de março de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Pires Goulart Guimaraes, Professor do Magistério Superior**, em 28/03/2024, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Membro de comissão**, em 02/04/2024, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederic Jean Georges Frezard, Professor do Magistério Superior**, em 02/04/2024, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helton da Costa Santiago, Professor do Magistério Superior**, em 03/04/2024, às 08:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Vitória Lopes Badra Bentley, Usuário Externo**, em 10/04/2024, às 19:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Teixeira de Carvalho, Usuário Externo**, em 12/04/2024, às 05:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3121868** e o código CRC **2194AF45**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 478 DE PEDRO HENRIQUE DIAS MOURA PRAZERES

Realizou-se, no dia 27 de março de 2024, às 14 horas, presencialmente, Sala 163 – 3º andar – Bloco K – Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, a defesa de Tese, intitulada *“Plataforma de Nanopartículas Lipídicas Ionizáveis Visando Imunoterapia do Câncer”*, apresentada por *Pedro Henrique Dias Moura Prazeres*, número de registro **2020712185**, graduado no curso de Farmácia, e como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: *Profa. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho*, FIOCRUZ/MG; *Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley*, USP; *Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frezard*, ICB/UFMG; *Prof. Dr. Helton da Costa Santiago*, ICB/UFMG; *Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto*, ICB/UFMG – **COORIENTADORA**; *Prof. Dr. Pedro Pires Goulart Guimarães*, ICB/UFMG – **ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Tese:

(X) APROVADA

() REPROVADA

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 27 de março de 2024.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Pires Goulart Guimaraes**, Professor do Magistério Superior, em 28/03/2024, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto**, Membro de comissão, em 02/04/2024, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederic Jean Georges Frezard**, Professor do Magistério Superior, em 02/04/2024, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Helton da Costa Santiago**,



Professor do Magistério Superior, em 03/04/2024, às 08:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Vitória Lopes Badra Bentley, Usuário Externo**, em 10/04/2024, às 19:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Teixeira de Carvalho, Usuário Externo**, em 12/04/2024, às 05:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3121864 e o código CRC 6A23B409.

Este trabalho foi executado no Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados (LABNANO) do Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG, CAPES, Ministério da Saúde e Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação

Agradecimentos

A toda minha família que torce pelo sucesso de cada um, e comemora como uma final de campeonato cada etapa vencida. Em especial, agradeço aos meus pais, Hêlvio e Marisa, que, como meus primeiros orientadores na vida, me ensinaram os caminhos e me apoiaram em cada escolha. Foi por todo o carinho, amor, dedicação e cuidado que vocês me dedicaram que passei pelo que passei e hoje estou aqui. Muito obrigado e amo vocês! À minha irmã Júlia e meu cunhado Cristóvão, que mesmo à distância sempre têm palavras de apoio e conselhos. E pela alegria que trouxeram à nossa família com o Gabriel (Gabrielzinho), que só enche nossos corações de amor, nossa casa de risadas e nosso sentimento de saudades.

À Mariana, meu amor, minha companheira de vida e de bancada. Você entende na teoria e na prática todo esse caminho que viemos traçando juntos, e me ajudou a crescer e melhorar cada dia mais. Por toda sua paciência, amor e carinho, só tenho que agradecer por ter você em minha vida! Também a família da Mariana, que me acolheu com todo o carinho do mundo e, com certeza, faz parte dessa trajetória.

Ao meu orientador Pedro Guimarães, pelo acolhimento em um momento complicado na caminhada acadêmica e por todos os ensinamentos que vieram a partir daí. Minha eterna gratidão por me apresentar ao “nanoverso” e mostrar que trabalhar “na fronteira do conhecimento” pode ser desafiador, mas é também muito gratificante e nada impossível.

À minha mãe científica e co-orientadora Helen Lima. Desde 2014-15 Helen sempre foi um exemplo de pesquisadora, professora e mãe, sempre acolhendo os alunos e se interessando por cada aspecto da caminhada de cada um. Não sei qual caminho tomaria na vida acadêmica se não tivesse escutado com o coração aberto cada puxão de orelha ou conselho dado.

Aos membros da banca Maria Vitória Bentley, Andréa Teixeira, Helton Santiago e Frédéric Frezard, por terem aceitado participar da defesa desse trabalho. Que nossa conversa possa abrir portas para o futuro!

Aos amigos (da pós) do laboratório, Pedro Augusto, Walison, Natália, Ana Luiza, Marco Tullio, Heloísa, Lays, Sérgio, Gabriel Henrique e Flávia. Vocês entendem cada perrengue, alegria, frustração e sonho que uma pessoa na vida acadêmica passa. Sou grato por cada conversa, lanche, experimento, café, puxão de orelha (da Nat) e festa que tivemos nos últimos anos e espero que tenhamos cada vez mais momentos como esses para lembrar no futuro.

Aos amigos (ICeres) do LABNANO Gabriel Vieira, Letícia, Pedro Araújo e Duda, pela ajuda no dia-a-dia e pelos cafés. Vocês são as mentes que a gente ousa tentar ensinar, então espero que tenha deixado algo positivo para vocês. Nunca se cansem de aprender e se dediquem, porque apesar da dificuldade, isso vale a pena.

A todos os amigos do LABNANO com quem não trabalho diretamente, mas tenho muita gratidão por conviver, Virgínia (e neném), Guilherme, Sabrina, Helane, Carol, Thaís e Cristiano.

Aos amigos do LCC, mesmo não participando tão ativamente das atividades esse grupo foi quem me acolheu em momentos difíceis e tenho só que agradecer à velha guarda

(Emerson, Bruna, Bárbara, Felipe e Camila) mas também à nova geração (Thacy, Ana, Manu, Day e os mais novos ainda).

Aos amigos do LIB, que me adotaram por livre e espontâneo vínculo afetivo com Mariana. Vocês que me adotaram com café e experimentos de lâmina própria, me ensinaram muito mais do que ciência e imunologia.

Aos colaboradores do LINBIO (prof. Adriano e técnicas), e aos colaboradores e pacientes do Ambulatório Borges da Costa, que me abriram as portas para os trabalhos com humanos. Cada paciente foi um aprendizado, e é necessário reconhecer que os produtos que tentamos gerar devem chegar da melhor forma a eles para que possam melhorar sua qualidade de vida no futuro.

À toda a equipe de manutenção (Odilon e companhia) e limpeza (Cássia, Cátia, Patrícia, Elisângela, Xande e todos os outros) do ICB, pessoas incríveis que muitas vezes passam invisíveis na correria do dia-a-dia.

Por todas as amigadas (novas e antigas) que tenho o maior prazer em cultivar no ICB. Amigos da Fisiologia, da Eletrocel Vítor, Marcos, Bruno, Amanda, Kiany e turma; da Endócrino Paula e Rodrigo; da Hipertensão Carol Fonseca. Amigos da Bioquímica/Imunologia Carol Leonel (desde 2017), Ana Elisa, Léo, Lucas e Beatriz (ICs), Tana, Filipe e turma do G3.

Aos colaboradores externos da UPenn por terem ajudado na escrita do artigo, e que isso possa abrir novas oportunidades!

A todos os técnicos e técnicas incontáveis que fazem os laboratórios do ICB funcionarem. Aos professores dos Departamentos de Patologia (Ênio, Ricardo, Paula, Geovanni), de Bioquímica e Imunologia (Ana Caetano, Tati, Helton, Leda) e de Fisiologia (Sílvia, Cibele, Lucíola, Frezard, Paula). Em especial a Professora Elaine Fagundes, minha primeira orientadora por quem desde 2013 eu tenho o maior respeito, por ter me ensinado tanto sobre ciência e como trabalhar corretamente na vida.

Aos meus amigos de fora das portas da UFMG, Gabriel “Zezé”, Alisson, Stephanie, Adelk, Hélder, Lucas e Giulia, por terem tanta paciência ouvindo Mariana e eu falarmos por horas e horas sobre coisas que podem não fazer sentido.

A todos com quem convivi, por menos que seja, nesses mais de 10 anos de UFMG, de alguma forma vocês deixaram marcas e aprendizados e, por isso, muito obrigado!

Às agências de financiamento CAPES, CNPq, FAPEMIG, Ministério da Saúde e Ministério de Ciência e Tecnologia, por acreditarem no potencial e na inovação dos nossos projetos.

“Todo abismo é navegável a barquinhos de papel”

Guimarães Rosa

“Focus on what is within your control”

Katalin Karikó

Resumo

A imunoterapia antitumoral representa um avanço importante no tratamento de neoplasias. Nesse contexto, plataformas de nanopartículas lipídicas ionizáveis (LNP) são alternativas para a entrega de ácidos nucleicos. Na produção de células CAR T, *ex vivo*, as LNPs podem ser utilizadas para induzir a expressão transiente do receptor, seja entregando DNA ou mRNA. Assim, oferecem uma alternativa para superar efeitos adversos observados com o uso de vetores virais. LNPs também podem ser otimizadas e funcionalizadas para entrega de ácidos nucleicos com alta especificidade para células de interesse. Além de oferecer uma alternativa para a produção de células CAR T *in vivo*, LNPs funcionalizadas encapsulando mRNA podem ser utilizadas como plataformas de vacinas terapêuticas contra câncer, promovendo uma resposta contra antígenos tumorais. Neste trabalho abordamos diferentes aplicações de uma plataforma de LNPs, como a otimização para a entrega de DNA e mRNA para produção de células CAR T *in vitro*, e também sua funcionalização para entrega direcionada a células mieloides. Na primeira parte deste trabalho, demonstramos que o aumento da razão molar de DOPE favorece a entrega de DNA para linfócitos T humanos. Identificamos uma formulação capaz de transfectar células Jurkat para expressão de CAR anti-CD19. Células transfectadas com a LNP aumentavam a expressão de marcadores de ativação (CD69 e PD1) quando co-cultivadas com células Raji (CD19⁺). Utilizando essa LNP, transfectamos linfócitos T humanos primários e demonstramos o potencial citotóxico dessas células contra células alvo CD19⁺. Demonstramos que a transfecção com a LNP otimizada nesse trabalho foi maior em células Jurkat do que a transfecção com a formulação sintetizada com lipídeos ionizáveis aprovados para uso em humanos. Utilizamos essa plataforma para entregar mRNA para expressão de CAR contra tumores sólidos, utilizando Claudina 6 como alvo (CAR-CLDN6). Para isso, sintetizamos o mRNA modificado com pseudouridina (ψ UTP) e entregamos esse mRNA para linfócitos T com a LNP otimizada. Demonstramos a transfecção em células Jurkat, e posterior ativação em co-cultura com células de carcinoma colorretal Colo-205 (CLDN6⁺). Linfócitos T humanos primários transfectados com a LNP encapsulando mRNA para CAR-CLDN6 foram efetivos contra células CLDN6⁺. Isso indica que a plataforma de LNPs pode ser utilizada também para a produção de células CAR T com mRNA. Por fim, funcionalizamos a LNP otimizada nos estudos *in vitro* com um anticorpo para CD11b para direcionar a entrega de mRNA-OVA para células mieloides *in vivo*. Para testar a plataforma funcionalizada utilizamos uma abordagem de vacina terapêutica, imunizando animais com a LNP antes da inoculação de células de melanoma expressando OVA (B16F10-OVA). Os dados do estudo *in vivo* demonstram que a vacina induziu resposta celular, com ativação de linfócitos e produção de citocinas, além de induzir um aumento na frequência de células mieloides apresentando MCH-II. Apesar de não ter controlado o crescimento do tumor, essa abordagem terapêutica abre novas possibilidades para a funcionalização e uso das LNPs entregando mRNA, sendo necessários mais estudos para ajuste de doses e utilização de novos alvos específicos para tumores sólidos.

Palavras-chave: Nanopartículas lipídicas ionizáveis; Entrega de ácidos nucleicos; Células CAR T; Imunoterapias; Vacinas terapêuticas.

Abstract

Antitumor immunotherapy is a hallmark in the treatment of cancer. In this context, ionizable lipid nanoparticle (LNP) platforms are alternatives for the delivery of nucleic acids. In the production of CAR T cells, *ex vivo*, LNPs can be used to induce transient expression of the receptor, whether delivering DNA or mRNA. Thus, they offer an alternative to overcome adverse effects observed with the use of viral vectors. LNPs can also be optimized and functionalized to deliver nucleic acids with high specificity to cells of interest. In addition of being an alternative for the production of CAR T cells *in vivo*, functionalized LNPs encapsulating mRNA can be used as therapeutic vaccine platforms against cancer, inducing an immune response against tumor antigens. In the present work we addressed different applications of an LNP platform, such as optimization for the delivery of DNA and mRNA for the production of CAR T cells *in vitro*, and also its functionalization for targeted delivery to myeloid cells. In the first part of this work, we demonstrated that increasing the molar ratio of DOPE favors the delivery of DNA to human T lymphocytes. We identified a formulation capable of transfecting Jurkat cells for anti-CD19 CAR expression. Cells transfected with LNP increased the expression of activation markers (CD69 and PD1) when co-cultured with Raji cells (CD19⁺). Using this LNP, we transfected primary human T lymphocytes and demonstrated the cytotoxic potential of these cells against CD19⁺ target cells. We demonstrated that transfection with the LNP optimized in this work was greater in Jurkat cells than transfection with the formulation synthesized with ionizable lipids already approved for use in humans. We used this platform to deliver mRNA for CAR expression against solid tumors, using Claudin 6 as a target (CAR-CLDN6). To achieve this, we synthesized mRNA modified with pseudouridine (ψ UTP) and delivered this mRNA to T lymphocytes with the optimized LNP. We demonstrated transfection in Jurkat cells, and subsequent activation in co-culture with Colo-205 (CLDN6⁺) colorectal carcinoma cells. Primary human T lymphocytes transfected with the LNP encapsulating mRNA for CAR-CLDN6 were effective against CLDN6⁺ cells. This indicates that the LNP platform can also be used to produce CAR T cells with mRNA. Finally, we functionalized the LNP optimized in the *in vitro* studies with a CD11b antibody for targeted delivery of OVA mRNA to myeloid cells *in vivo*. To test the functionalized platform, we used a therapeutic vaccine approach, immunizing animals with LNP prior to inoculation of OVA-expressing melanoma cells (B16F10-OVA). Data from the *in vivo* study demonstrate that the vaccine induced a cellular response, with activation of lymphocytes and production of cytokines, in addition to inducing an increase in the frequency of myeloid cells presenting MCH-II. Despite not having controlled tumor growth, this therapeutic approach opens up new possibilities for the functionalization and use of LNPs delivering mRNA, requiring further studies to adjust doses and use new specific targets for solid tumors.

Keywords: Ionizable lipid nanoparticles; nucleic acid delivery; CAR T cells; Immunotherapies; Therapeutic vaccines

Lista de figuras

Figuras da tese:

Figura 1: Exemplos de terapias com inibidores de <i>checkpoint</i> imunológicos	19
Figura 2: Exemplos de terapias com células adotivas	20
Figura 3: Estrutura dos receptores CAR	22
Figura 4: Ciclo produtivo da terapia CAR T	25
Figura 5: Representação esquemática do desenvolvimento de vacina personalizada contra câncer	26
Figura 6: Processamento intracelular de LNPs carreando ácidos nucleicos	33
Figura 7: Mapa dos plasmídeos utilizados para transfecção com pDNA	39
Figura 8: Tiolação de anticorpo e funcionalização de LNP	40
Figura 9: Mapa do plasmídeo utilizado para IVT	42
Figura 10: Síntese e caracterização de LNPs sintetizadas com diferentes lipídeos ionizáveis encapsulando pDNA para ZsGreen	87
Figura 11: Transfecção com LNPs sintetizadas com diferentes lipídeos ionizáveis	89
Figura 12: Géis para confirmação do tamanho dos fragmentos de ácidos nucleicos	90
Figura 13: Síntese e caracterização de LNPs encapsulando mRNA para CAR-CLDN6	91
Figura 14: Transfecção de células Jurkat com LNPs encapsulando mRNA CAR-CLDN6	92
Figura 15: Ativação de células Jurkat transfectadas com mRNA CAR-CLDN6	94
Figura 16: Transfecção de linfócitos T humanos primários com LNPs encapsulando mRNA CAR-CLDN6	95
Figura 17: Efeito citotóxico de linfócitos CAR T anti-CLDN6 <i>in vitro</i> contra células Colo-205	97
Figura 18: Síntese e caracterização de LNPs encapsulando mRNA-OVA para funcionalização	102
Figura 19: Captação <i>in vitro</i> de LNPs	103
Figura 20: Efeito protetivo da vacina terapêutica de mRNA-OVA	104
Figura 21: Ativação e produção de citocinas por células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	105
Figura 22: Frequência de células mieloides	107
Figura 23: Produção de citocinas por células dendríticas	108

Figuras do artigo:

Fig. 1 – Schematic workflow for the optimization of DNA-loaded LNPs for the expression of CAR-CD19BBz 71

Fig. 2 – DNA loaded LNPs induce transient expression of CAR-CD19BBz in Jurkat cells 72

Fig. 3 – Higher DOPE molar ratios facilitate efficient transfection with CAR-CD19BBz in Jurkat cells 74

Fig. 4 – Top-performing LNPs generate CAR-Jurkat cells with high efficiency 76

Fig. 5 – LNP-9-CAR promotes functional delivery of pDNA to primary human T cells 78

Fig. S1 – Structure of the lipid components used to generate LNPs 81

Fig. S2 – Formulations with high DOPE molar ratios promote efficient transfection of Jurkat cells *in vitro* 82

Fig. S3 – Correlation between helper lipids and transfection efficiency of LNPs in Jurkat cells 84

Fig. S4 – Morphological and physical-chemical characterization of top-performing LNPs 84

Fig. S5 – Optimized formulation for transfection of T cells induces the expression of ZsGreen on Jurkat cells *in vitro* 85

Lista de tabelas

Tabelas da tese:

Tabela 1: Terapias CAR T aprovadas para tumores hematológicos	24
Tabela 2: Estudos clínicos utilizando células CAR T para tumores hematológicos	24
Tabela 3: Estudos clínicos utilizando células CAR T para tumores sólidos	30
Tabela 4: Anticorpos para proteínas de superfície humanas e marcadores de viabilidade	47
Tabela 5: Anticorpos para proteínas murinas, streptavidina e marcador de viabilidade	49
Tabela 6: Composição e caracterização das LNPs sintetizadas com diferentes lipídeos ionizáveis encapsulando pDNA para ZsGreen	87
Tabela 7: Composição e caracterização das LNPs encapsulando mRNA para CAR-CLDN6	91
Tabela 8: Composição e caracterização das LNPs encapsulando mRNA-OVA	101

Tabelas do artigo

Table 1: Composition and characterization of pDNA-ZsGreen encapsulated in LNPs with different DOPE and Cholesterol ratios	79
Table 2: Composition and characterization of pDNA-CAR-CD19BBz encapsulated LNPs with different DOPE and Cholesterol ratios	80

Lista de siglas e abreviaturas

°C – grau Celsius
μL – microlitro
ACT – Terapia de células adotivas (do inglês, *Adoptive cell therapy*)
ANOVA – Análise de variância
APCs – Células apresentadoras de antígenos (do inglês, *Antigen presenting cells*)
ATCC – empresa com nome derivado do inglês *American type cell culture*
BCI – Bloqueadores de checagem imunológica
Bcl-2 – Gene com nome derivado do inglês *B cell lymphoma 2*
BCMA – Antígeno de maturação de células B (do inglês, *B cell maturation antigen*)
BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro
CAPI – Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CAR – Receptor Quimérico de Antígeno (do inglês, *Chimeric Antigen Receptor*)
CD – Grupos de diferenciação (do inglês, *Cluster of differentiation*)
CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais
CLDN6 – Claudina 6
CO₂ – Dióxido de carbono
COEP
CTLA4 - Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*)
DiD
DLS – Espalhamento dinâmico da luz (do inglês, *Dynamic light spreading*)
DOE – Desenho de experimento (do inglês, *Design of experiment*)
DOPE - 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
E:A – Razão efetora alvo
EDTA - Etilenodietiltetraacetato
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico
EUA – Estados Unidos da América
FDA – Agência regulatória de medicamentos e alimentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)
GM-CSF
HDs – Doadores saudáveis (do inglês, *Healthy donos*)
IFN-γ – Interferon gamma
IL – Interleucina
INCA – Instituto Nacional do Câncer
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
IVT – Transcrição *in vitro* (do inglês, *In vitro transcription*)
LLA – Leucemia linfocítica aguda
LLC – Leucemia linfocítica crônica
LNP – Nanopartícula lipídica ionizável (do inglês, *Lipid nanoparticle*)
MFI – Intensidade média de fluorescência (do inglês, *Mean fluorescence intensity*)
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal (do inglês, *Major histocompatibility complex*)
mL – mililitro

mM – milimolar
ng – nanograma
NK – Matadoras naturais (do inglês, *Natural killers*)
nm – nanômetro
ns – Não significativo
NTC – Controle não transfectado (do inglês, *Not transfected control*)
OVA – Ovalbumina
pb – Pares de bases
PBMC – Células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *Peripheral blood mononuclear cells*)
PBS – Solução tampão fosfato
PD1 – Morte programada-1 (do inglês, *Programmed cell death-1*)
PDI – Índice de polidispersão (do inglês, *Polydispersion index*)
PDL1 – Morte programada ligante-1 (do inglês, *Programmed death-ligand 1*)
PEG – Polietilenoglicol
pH – potencial hidrogeniônico
RPM – Rotações por minuto
RPMI – meio de cultura com nome derivado do inglês *Roswell Park Memorial Institute*
scFv – Fragmento único da porção variável (do inglês, *Single chain variable fragment*)
SFB – Soro Fetal Bovino
T $\gamma\delta$ – Células T gamma delta
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR – Receptor de células T (do inglês, *T cell receptor*)
TIL – Linfócitos infiltrantes do tumor (do inglês, *Tumor infiltrating lymphocytes*)
TME – Microambiente tumoral (do inglês, *Tumor microenvironment*)
TNF α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor necrosis fator alfa*)
TNS – 6-(p-Toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid sodium salt
U/mL – Unidades por mililitro
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. Imunoterapia no câncer	22
2.1.1 Terapias com células adotivas	24
2.1.1.1 Terapia CAR T	26
2.1.1.2. Produção de células CAR T	28
2.1.2. Vacinas para câncer	31
2.2. Tumores hematológicos.....	32
2.3. Tumores sólidos	34
2.3.2. Claudina como alvo de imunoterapias para tumores sólidos.....	36
2.4. Nanopartículas lipídicas.....	37
2.5. Uso de DNA e mRNA na terapia CAR T	40
2.6. Testes <i>in vitro</i> para transfecção e funcionalidade de células CAR T	41
3. JUSTIFICATIVA	42
4. OBJETIVOS	43
5. METODOLOGIA.....	43
5.1. Síntese e caracterização de LNPs	43
5.1.2. Preparação de LNPs com lipídeos comerciais	44
5.1.3. Preparação de LNPs com PEG modificado e funcionalização com anticorpo.....	45
5.1.4. Análise de pKa aparente	46
5.1.5. Eficiência de encapsulação.....	46
5.2. Síntese de mRNA por <i>in vitro transcription</i> (IVT)	47
5.3. Linhagens celulares e experimentos de transfecção e captação <i>in vitro</i> ..	48
5.3.2. Avaliação da transfecção de LNPs em células Jurkat.....	49
5.3.3. Controles positivos de transfecção	49
5.3.4. Captação de LNPs funcionalizadas com anticorpo	50
5.4. Amostras humanas e aspectos éticos.....	50
5.4.1. Aspectos éticos da pesquisa.....	50
5.4.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)....	50
5.4.3. Purificação e transformação de linfócitos T.....	51
5.8. Experimentos funcionais utilizando células Jurkat.....	51
5.6. Experimentos funcionais utilizando linfócitos CAR T	52
5.7. Experimentos <i>in vivo</i>	52

5.7.1. Cultura de esplenócitos, estímulo <i>in vitro</i>	53
5.7.2. Citometria de fluxo para análise de esplenócitos.....	53
5.8. Análise estatística.....	55
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1. Capítulo 1 – Produção de linfócitos CAR T anti-CD19 utilizando LNPs carreando DNA	55
6.2. Capítulo 2 - Aplicação de mRNA modificado para produção de células CAR T para tumores sólidos	91
6.2.1. Comparação da transfecção com LNP-9 com diferentes lipídeos ionizáveis	91
6.2.2. Síntese de mRNA CAR-CLDN6 modificado por IVT.....	94
6.2.3. Transfecção de células Jurkat com mRNA CAR-CLDN6 e ativação....	96
6.3. Capítulo 3 - Desenvolvimento piloto de vacina terapêutica utilizando LNP funcionalizada encapsulando mRNA-OVA	105
6.3.1. A funcionalização induz mudanças físico-químicas nas LNPs.....	105
6.3.2. A captação da LNP funcionalizada é mais efetiva em momentos iniciais	107
6.3.3. A imunização com LNP funcionalizada induz ativação de linfócitos T e produção de citocinas	108
6.3.4. A resposta de células mieloides à imunização com LNP funcionalizada produz resposta celular antitumoral	112
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	115
8. PRODUÇÕES E PREMIAÇÕES	117
9. REFERÊNCIAS	118
10. ANEXOS	134
10.1. Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido	134
10.3. Anexo II – Estratégia de análise para identificação de linfócitos	139
10.4. Anexo III – Estratégia de análise para identificação de células mieloides	140
10.5. Anexo IV – Artigo relacionado a tese	141
10.6. Anexo V – Auxílio viagem para congresso internacional	142
10.7. Anexo VI – Relevância acadêmica	143
10.8. Anexo VII – Artigo colaboração	144
10.9. Anexo VIII – Artigo colaboração	145
10.9. Anexo IX – Artigo colaboração	146
10.9. Anexo X – Patente	147

1. INTRODUÇÃO

O câncer, em suas mais variadas formas representa várias doenças em si, é a segunda principal causa de mortalidade em todo o mundo, e permanece como um dos maiores desafios para a saúde pública no Brasil e no mundo (INCA, 2023; SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021). O aumento na incidência e mortalidade dessa doença estão associados ao estilo de vida e às mudanças ambientais pelas quais o mundo está passando (INCA, 2023). Isso justifica a importância e necessidade de investimento e dedicação à pesquisa básica e clínica para desenvolver abordagens preventivas e terapêuticas contra essa doença.

As terapias atuais apresentam bons resultados clínicos, no entanto, o risco de recidiva ou de resistência aos tratamentos ainda é alto (HALLEK; SHANAFELT; EICHHORST, 2018). Nesse contexto, as imunoterapias utilizando diferentes tecnologias servem como alternativas viáveis (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011). Dentre essas a terapia celular baseada em linfócitos T foi revolucionada pelo uso de Receptores Quiméricos de Antígenos (CARs), por sua especificidade e eficácia contra tumores hematológicos (JUNE; O'CONNOR; KAWALEKAR; GHASSEMI *et al.*, 2018). Algumas barreiras, como o método de produção e escolha da proteína alvo, dificultam a aplicação da terapia CAR T (SEOW; WOOD, 2009). Apesar de bem estabelecida para o tratamento de alguns tumores hematológicos, com produtos aprovados no Brasil, essa terapia segue em estudo para sua aplicação contra tumores sólidos, com estudos clínicos para hepatocarcinoma, tumores pediátricos, e neuroblastoma (ANVISA, 2020; GUZMAN; REED; BIELAMOWICZ; KOSS *et al.*, 2023; JUNE; O'CONNOR; KAWALEKAR; GHASSEMI *et al.*, 2018).

A utilização de plataformas de nanopartículas lipídicas ionizáveis visa melhorar o processo produtivo das células CAR T (RIEDL; KAISER; RAUP; SYNATSCHKE *et al.*, 2018; RILEY; JUNE; LANGER; MITCHELL, 2019). Essas plataformas garantem a entrega de ácidos nucleicos para células alvo de forma rápida e eficaz, sem afetar a viabilidade das células manipuladas e sem a integração genômica do construto, ao contrário dos vetores virais atualmente utilizados na clínica para manipulação das células T (PRAZERES; FERREIRA; COSTA; DA SILVA *et al.*, 2023). As nanopartículas também podem ser otimizadas para entrega de diferentes ácidos nucleicos (DNA, mRNA

e siRNA, por exemplo), demonstrando seu potencial em diversos contextos, inclusive na aplicação de imunoterapias e desenvolvimento de vacinas (COSTA; DA SILVA; MOURA PRAZERES; FERREIRA *et al.*, 2024; GUIMARAES; COSTA; SCALZO JUNIOR; FERREIRA *et al.*, 2024; GUIMARÃES; FIGUEROA-ESPADA; RILEY; GONG *et al.*, 2023).

A variedade de construtos que podem ser entregues utilizando nanopartículas abre algumas perspectivas. Com essas plataformas, podem ser desenvolvidos tratamentos de forma imediata (“*off-the-shelf*”) para diferentes tumores, ou uma terapia personalizada, direcionada à alguma especificidade do paciente (ALGHAMDI; FALLICA; VIRZÌ; KESHARWANI *et al.*, 2022). No entanto, a pesquisa básica deve auxiliar no desenvolvimento racional dessa tecnologia, garantindo dados suficientes para uma futura translação clínica.

Nesse contexto, a proposta do presente trabalho foi desenvolver uma plataforma de nanopartículas lipídicas utilizada *in vitro* na entrega de DNA e mRNA em linfócitos para produção de células CAR T para tumores hematológicos e sólidos, respectivamente. Além disso, essa plataforma pode ser modificada para utilização *in vivo* como forma de entregar mRNA para células específicas, abrindo possibilidades tanto para novas imunoterapias como o desenvolvimento de vacinas contra tumores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Imunoterapia no câncer

A imunoterapia representa um marco no tratamento de tumores hematológicos e sólidos. Os agentes imunoterápicos atuam induzindo uma resposta imune imediata contra as células tumorais, podendo melhorar a ativação de células endógenas (por exemplo, anticorpos monoclonais anti-*Programmed Cell Death 1* (PD1)) ou exercer seguramente a função de células efectoras (por exemplo, terapia com células CAR T) (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011). As primeiras imunoterapias aprovadas no final dos anos 1980-1990 utilizavam citocinas como IFN α para o tratamento de leucemias (AHMED; RAI, 2003) e IL-2 para o tratamento de melanomas (ROSENBERG, 2014). Apesar do sucesso inicial dessas terapias, o desenvolvimento de eventos adversos como a síndrome da liberação de citocinas (tempestade de citocinas) retraiu sua aplicação clínica (ALWAN; GROSSMANN; SAGESER; VAN ATTA *et al.*, 2014).

No fim dos anos 1990 foi aprovado, pela *Food and Drug Administration* (FDA), o Rituximabe (anticorpo monoclonal anti-CD20) para o tratamento de alguns tipos de linfomas, sendo que seu uso foi também aprovado para terapia de leucemia linfocítica crônica em combinação com o Ibrutinibe (BURGER; KEATING; WIERDA; HARTMANN *et al.*, 2014; GRILLO-LÓPEZ; WHITE; DALLAIRE; VARNS *et al.*, 2000). Os primeiros anticorpos monoclonais, denominados bloqueadores de *checkpoint* imunológico (BCIs), foram aprovados no início dos anos 2010. O Ipilimumabe (anti-*Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein 4* (CTLA4)) e o Pembrolizumabe (anti-PD1/PDL1) representaram um grande avanço na terapia de tumores sólidos, principalmente melanomas metastáticos (HODI; O'DAY; MCDERMOTT; WEBER *et al.*, 2010).

A utilização de BCIs demonstrou uma possibilidade de se melhorar a ativação das células imunes, principalmente linfócitos T, possibilitando o reconhecimento efetivo de células tumorais e sua consequente eliminação (**Figura 1**) (ALSAAB; SAU; ALZHRANI; TATIPARTI *et al.*, 2017; WEBB; LIU; BALEEIRO; LEMOINE *et al.*, 2018). Em 2013, a importância desses agentes terapêuticos foi reconhecida pela revista *Science* como uma das “descobertas do ano”, e também garantiu um prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina aos seus desenvolvedores em 2018 (COUZIN-FRANKEL, 2013; HUANG; CHANG, 2019). Apesar do seu sucesso na clínica, o uso dos BCIs apresenta limitações como a autoimunidade associada à administração sistêmica desses anticorpos, e a baixa taxa de resposta em alguns pacientes (JUNE; WARSHAUER; BLUESTONE, 2017; RESTIFO; SMYTH; SNYDER, 2016). Alguns métodos, como a utilização de sistemas nanoestruturados, vêm sendo estudados para sobrepor essas barreiras associadas às imunoterapias (IRVINE; DANE, 2020; RILEY; JUNE; LANGER; MITCHELL, 2019). No entanto, outras formas de se cooptar o sistema imune na resposta antitumoral vêm sendo desenvolvidas utilizando células endógenas ou alogênicas.

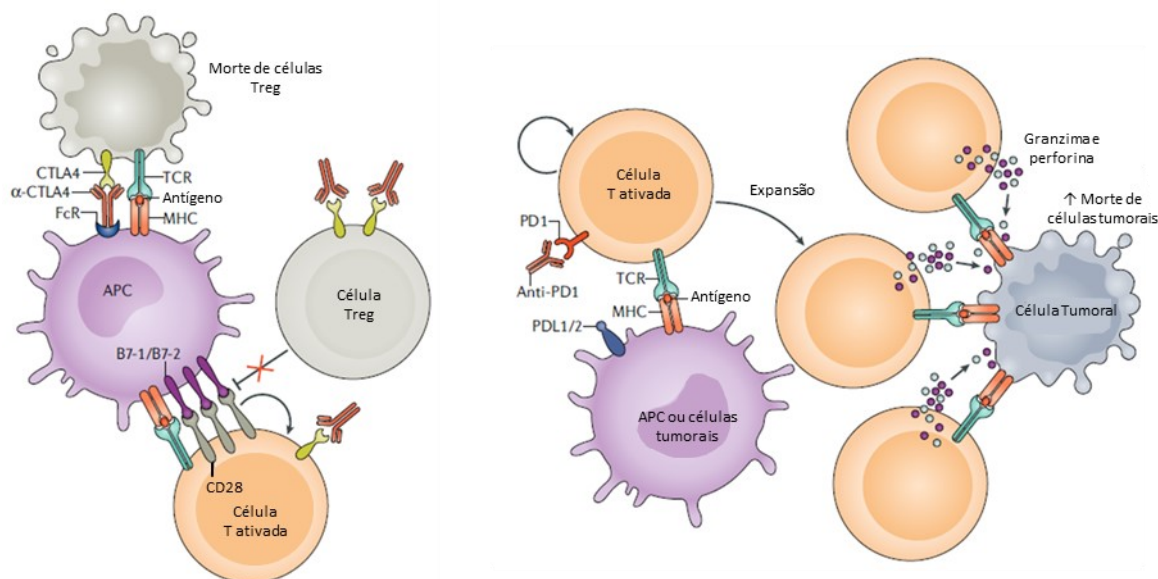


Figura 1: Exemplos de terapias com inibidores de *checkpoint* imunológicos. Imagem à esquerda demonstra o mecanismo de anticorpos anti-CTLA4 na ativação de células T por APCs. Imagem à direita demonstra o mecanismo do bloqueio de PD1, possibilitando a expansão e produção de citocinas por linfócitos T ativados. Adaptado de Waldman et al., 2020 (WALDMAN; FRITZ; LENARDO, 2020).

2.1.1 Terapias com células adotivas

Billingham e colaboradores, em 1954, descreveram uma forma de utilizar o transplante de linfócitos efetores como forma de desenvolver uma “imunidade adquirida” (BILLINGHAM; BRENT; MEDAWAR, 1954). Com o passar do tempo essa técnica foi aprimorada, e atualmente é utilizado o termo terapia celular adotiva (ACT, do inglês *Adoptive Cell Therapy*) (**Figura 2**). Três formas principais de ACT estão sendo aplicadas e melhoradas para a terapia antitumoral. São a transferência de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs), uso de células T com TCR específicos e uso de células CAR T (JUNE; O’CONNOR; KAWALEKAR; GHASSEMI *et al.*, 2018). Os diferentes tipos de ACT já vem sendo utilizados no tratamento de algumas neoplasias, incluindo leucemias (MA; PADMANABHAN IYER; PARMAR; GONG, 2019; ZHANG; ZHANG; LIU; WEI *et al.*, 2019).

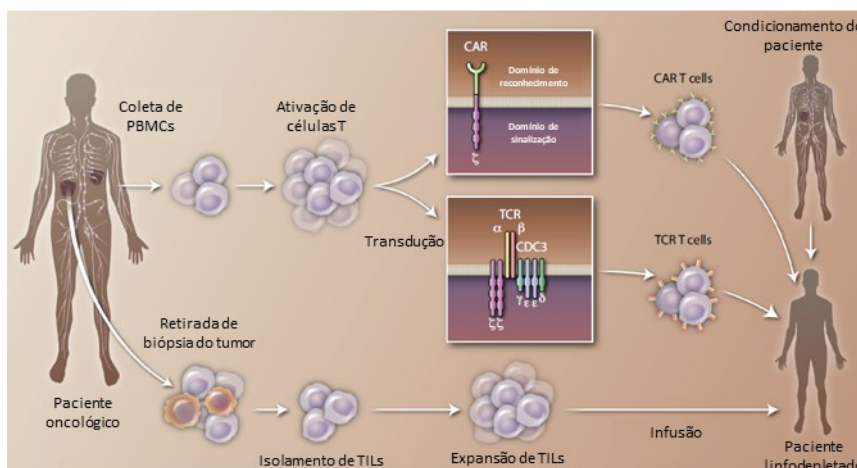


Figura 2: Exemplos de terapias com células adotivas. Adaptado de June et al. 2015. (JUNE; RIDDELL; SCHUMACHER, 2015)

No início da ACT, as células imunes eram extraídas diretamente de biópsias do tumor (TILs). Com isso, foram identificadas as primeiras limitações como baixa quantidade de linfócitos em pacientes previamente tratados com quimioterápicos; necessidade de selecionar células responsivas a antígenos tumorais; *status* de ativação dos linfócitos isolados e surgimento de tolerância imunológica das células tumorais (ROSENBERG; RESTIFO, 2015). Como forma de superar essas dificuldades, passaram a ser estudadas estratégias de transferência gênica para os linfócitos; essas, se baseiam na expressão de TCRs (*T cell receptor*) específicos ou de CAR (JUNE; RIDDELL; SCHUMACHER, 2015).

O TCR é um receptor de membrana presente em células T composto por seis subunidades. As subunidades α e β são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos pelo complexo MHC-peptídeo em células apresentadoras de antígeno ou em células tumorais. As subunidades γ , δ , ϵ e principalmente a ζ estão envolvidas na sinalização intracelular desencadeada após a interação TCR-complexo MHC (BANIYASH, 2004). A possibilidade de transformar linfócitos efetores para expressarem um TCR de alta afinidade a um antígeno tumoral resultou em uma resposta aumentada no tratamento de melanoma. No entanto, essa abordagem também resultou em efeitos adversos pelo reconhecimento desse antígeno em melanócitos saudáveis na pele, olhos e cóclea, sendo necessário desenvolver novas abordagens para melhorar a resposta imune das células adotivas transformadas *ex vivo* (JOHNSON; MORGAN; DUDLEY; CASSARD *et al.*, 2009).

2.1.1.1 Terapia CAR T

No fim da década de 1980 foi descrito que esses receptores quiméricos possibilitam a célula T reconhecer um peptídeo alvo independente da interação TCR-complexo MHC (KUWANA; ASAKURA; UTSUNOMIYA; NAKANISHI *et al.*, 1987). Isso representou uma grande vantagem na imunoterapia antitumoral, uma vez que a perda de apresentação antigênica via MHC é um dos mecanismos de imunoevasão das células tumorais (GARRIDO; APTSIAURI; DOORDUIJN; GARCIA LORA *et al.*, 2016).

A estrutura do receptor CAR pode ser dividida em três domínios como representado na **Figura 3**, as porções extracelular, transmembranar e intracelular.

O domínio extracelular é responsável pelo reconhecimento do antígeno tumoral específico. Essa porção do receptor, denominada *single chain variable fragment* (scFv), é composta por domínios de ligação a antígenos derivados das porções variáveis pesadas (V_H) e leves (V_L) de anticorpos monoclonais (CASTELLARIN; SANDS; DA; SCHOLLER *et al.*, 2020). Os scFvs presentes em linfócitos CAR T reconhecem antígenos de superfície presentes em células neoplásicas, resultando em uma ativação independente do reconhecimento TCR-complexo MHC. Além de ser responsável por reconhecer e se ligar ao alvo específico, a interação das cadeias V_H e V_L , sua complementariedade e especificidade ao epítipo também influenciam o perfil de segurança e eficácia da terapia (CHAILYAN; MARCATILI; TRAMONTANO, 2011; JENSEN; POPPLEWELL; COOPER; DIGIUSTO *et al.*, 2010). A afinidade do scFv pelo epítipo é o principal fator que determina a funcionalidade do linfócito CAR T. No entanto, deve ser modulada para que o reconhecimento seja o suficiente para ativar o linfócito, mas não tão intenso a ponto de induzir sua morte (STERNER; STERNER, 2021). Atualmente, estudos que visam melhorar a resposta de células CAR utilizam o CD19 como alvo para prova de conceito (MAJZNER; RIETBERG; SOTILLO; DONG *et al.*, 2020).

Ainda no domínio extracelular o receptor possui uma estrutura denominada *hinge* ou espaçador. Essa estrutura liga a porção scFv ao domínio transmembranar, garantindo flexibilidade e diminuindo impedimentos estéricos que dificultariam a ligação com o epítipo (HUDECEK; SOMMERMEYER; KOSASIH; SILVA-BENEDICT *et al.*, 2015). O tamanho e a composição desse espaçador podem afetar a função, expressão e

reconhecimento do alvo pelo CAR, e geralmente derivam da estrutura do CD8 ou CD28 (STERNER; STERNER, 2021).

O domínio transmembranar do CAR é um dos menos caracterizados pela literatura. Sua função principal é ancorar o receptor à membrana, no entanto, essa estrutura é descrita por auxiliar a ativação do linfócito após o reconhecimento do antígeno, contribuindo inclusive na produção de citocinas (ABATE-DAGA; DAVILA, 2016; ALABANZA; PEGUES; GELDRES; SHI *et al.*, 2017). Assim como o espaçador, o domínio transmembranar geralmente deriva da estrutura do CD8 ou CD28 (ALABANZA; PEGUES; GELDRES; SHI *et al.*, 2017).

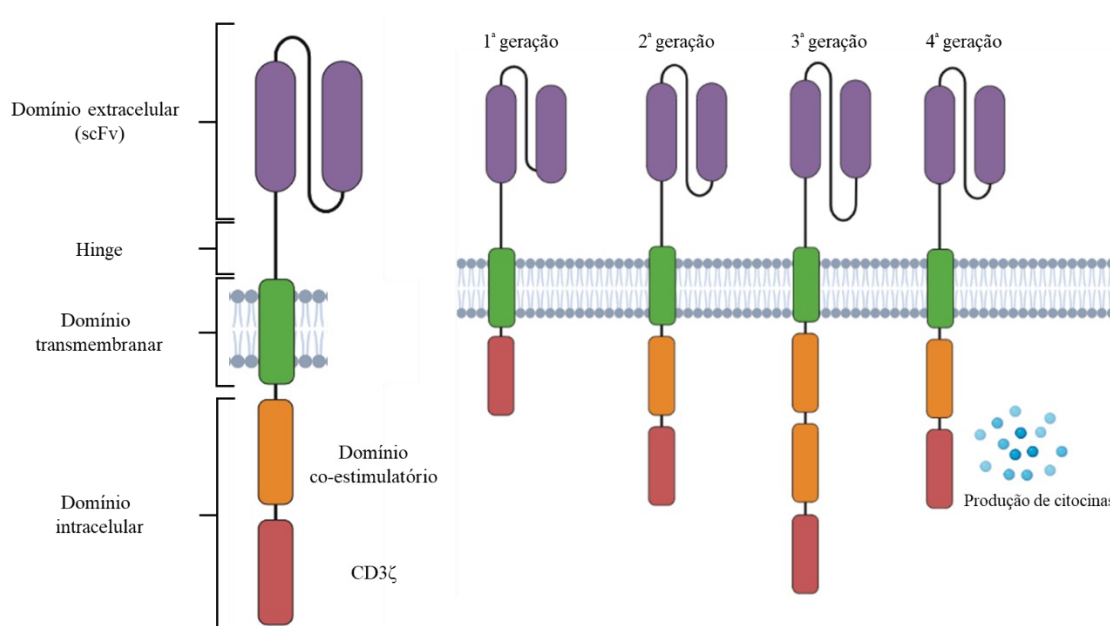


Figura 3: Estrutura dos receptores CAR. Adaptado de June et al., 2018 (JUNE; O'CONNOR; KAWALEKAR; GHASSEMI *et al.*, 2018). Representação esquemática do receptor CAR detalhando os domínios extracelular, transmembranar e intracelular (imagem à esquerda) e representação esquemática das diferentes gerações de receptores CAR (imagem à direita).

O domínio intracelular é um dos mais estudados durante o desenvolvimento novos construtos de CAR, provavelmente por influenciar diretamente a ativação e sobrevivência do linfócito transformado (CAPPELL; KOCHENDERFER, 2021). Esse domínio é responsável por iniciar a sinalização proveniente do reconhecimento do antígeno, e vem sendo aprimorado com o desenvolvimento das novas gerações de CAR (STERNER; STERNER, 2021).

As gerações do receptor CAR passaram a ser desenvolvidas a partir da década de 1990, com a primeira geração expressando como domínio intracelular apenas a subunidade ζ do TCR. No entanto, testes clínicos com CAR de primeira geração tiveram resultados ruins, com baixa resposta dos pacientes (JUNE; O'CONNOR; KAWALEKAR; GHASSEMI *et al.*, 2018). Savoldo e colaboradores demonstraram que a adição de um domínio co-estimulatório (CD28) associada a subunidade ζ apresentou uma melhora significativa em pacientes com linfoma (SAVOLDO; RAMOS; LIU; MIMS *et al.*, 2011). A partir daí surgiram os CAR de segunda geração, que possuem além da subunidade ζ um domínio co-estimulatório CD28 ou 4-1BB e, em seguida, os CAR de terceira geração que possuem dois domínios co-estimulatórios (ABATE-DAGA; DAVILA, 2016). A quarta geração de CAR possibilita, além do reconhecimento de antígenos tumorais específicos e ativação do linfócito, a modulação do microambiente tumoral pela produção de citocinas (REINHARD; RENGSTL; OEHM; MICHEL *et al.*, 2020).

2.1.1.2. Produção de células CAR T

A expressão de CAR em linfócitos T para ACT depende da manipulação *ex vivo* e transferência de material genético exógeno para essas células (SEOW; WOOD, 2009), e o ciclo de produção desses linfócitos está representado na **Figura 4**. O método mais utilizado atualmente, aplicado em terapias já aprovadas e em estudos clínicos, é a transformação dos linfócitos utilizando vetores virais (lentivírus ou retrovírus) (SEOW; WOOD, 2009). Alguns estudos vêm sendo realizados utilizando eletroporação como método de produção de células CAR T (CHICAYBAM; ABDO; VIEGAS; MARQUES *et al.*, 2020). De forma semelhante aos vetores virais, a eletroporação induz uma integração do construto do CAR ao genoma do linfócito, porém demanda um menor tempo de manipulação das células *ex vivo* (DE MACEDO ABDO; BARROS; SALDANHA VIEGAS; VIEIRA CODEÇO MARQUES *et al.*, 2020).

Os alvos mais utilizados em terapias CAR T para leucemias, bem como métodos de produção e estudos sobre o avanço dessa terapia no mundo foram revisados recentemente por Ahmad e colaboradores e Wei e colaboradores (AHMAD; UDDIN; STEINHOFF, 2020; WEI; GUO; WANG; WU *et al.*, 2021). Os produtos aprovados tem como alvo os marcadores CD19 e *B cell maturation antigen* (BCMA) (**Tabela 1**), porém alguns estudos clínicos vêm explorando outros marcadores para tumores hematológicos

(**Tabela 2**) (ASMAMAW DEJENIE; TIRUNEH; DESSIE TEREFE; TADELE ADMASU *et al.*, 2022; WANG; GAUTHIER; DECOT; REPPPEL *et al.*, 2023).

Tabela 1: Terapias CAR T aprovadas para tumores hematológicos

Nome genérico	Nome comercial	Alvo	Indicações	Data de aprovação
Tisagenlecleucel	Kymriah	CD19	LLA de células B	30 de Agosto de 2017
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta	CD19	Linfoma de grandes células B	18 de Outubro de 2017
Brexucabtagene autoleucel	Tecartus	CD19	Linfoma de células do manto e LLA de células B	24 de Julho de 2020
Lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	CD19	Linfoma difuso de grandes células B	5 de Fevereiro de 2021
Idecabtagene vicleucel	Abecma	BCMA	Mieloma múltiplo	26 de Março de 2021
Citacabtagene autoleucel	Carvukti	BCMA	Mieloma múltiplo	28 de Fevereiro de 2022

Adaptado de Asmamaw *et al.*, 2022 (ASMAMAW DEJENIE; TIRUNEH; DESSIE TEREFE; TADELE ADMASU *et al.*, 2022).

Tabela 2: Estudos clínicos utilizando células CAR T para tumores hematológicos

Número do estudo	Alvo	Indicações	Fase	Referência (DOI)
NCT03277729	CD20	Linfoma não-Hodgkin	Fase 1/2	10.3324/haematol.2017.186742
NCT03262298	CD22	LLA de células B	Fase 1/2	10.1182/blood-2019-130654
NCT02690545	CD30	Linfoma de Hodgkin	Fase 1/2	10.1056/NEJMoa1407222
NCT02203825	NKG2D	Leucemia mieloide aguda	Fase 1	10.1182/blood-2020-136440
NCT03971799	CD33	Leucemia mieloide aguda	Fase 1/2	Recrutando/não publicado
NCT04014881	CD123	Leucemia mieloide aguda	Fase 1	Recrutando/não publicado
NCT04010877	CLL-1/CD123/CD33	Leucemia mieloide aguda	Fase 1/2	Recrutando/não publicado
NCT05023707	FLT3	Leucemia mieloide aguda	Fase 1/2	10.3389/fimmu.2020.580328
NCT02842320	IL-1RAP	Leucemia mieloide crônica	Fase 1/2	10.3390/vaccines9111238
NCT04689659	CD7	LLA de células T	Fase 1/2	10.1038/nm.4441
NCT02203825	NKG2D	LLA de células T, leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo	Fase 1	10.1182/blood-2020-136440
NCT04351022	CD38	Leucemia mieloide aguda	Fase 1/2	10.1158/0008-5472.CAN-18-1078
NCT03081910	CD5	Linfoma de Hodgkin de células T	Fase 1	10.1186/s13045-021-01092-4
NCT04712864	CD4	Linfoma de células T	Fase 1	10.1016/j.bbmt.2019.12.482
NCT04594135	CD5	LLA de células T	Fase 1	10.1155/2021/6614784

Adaptado de Asmamaw *et al.*, 2022 (ASMAMAW DEJENIE; TIRUNEH; DESSIE TEREFE; TADELE ADMASU *et al.*, 2022).

O uso de vetores virais integrativos eleva o custo de produção das células CAR T. Associado a esse custo elevado, a incorporação do CAR ao genoma e sua expressão permanente no linfócito, estão relacionados à imunogenicidade induzida pela terapia e a alguns efeitos adversos a longo prazo (WAGNER; FRITSCH; PULSIPHER; AHMED *et al.*, 2021).

Uma alternativa ao uso de vetores virais é a transformação de linfócitos utilizando nanopartículas lipídicas (LNPs). Essas LNPs servem como carreadores de material genético (DNA ou mRNA) e possibilitam uma expressão transiente do CAR, além de reduzir o custo quando comparadas à produção de vetores virais (BILLINGSLEY; SINGH; RAVIKUMAR; ZHANG *et al.*, 2020).

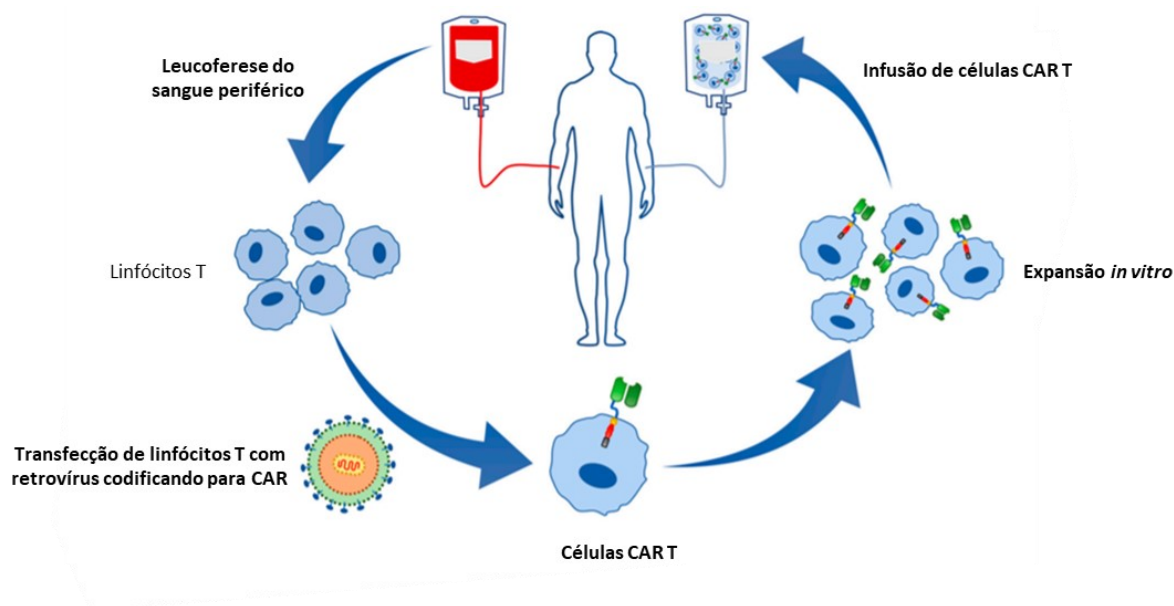


Figura 4: Ciclo produtivo da terapia CAR T. Adaptado de Britten et al. 2019 (BRITTEN; RAGUSA; TOSI; MOSTAFA KAMEL, 2019). Representação do ciclo produtivo de células CAR T. Esse processo se inicia com a coleta de linfócitos a partir do sangue periférico de pacientes. Os linfócitos são então transfectados por vetores virais e expandidos *in vitro* antes da reinfusão para o paciente.

Em resumo, as imunoterapias baseadas em células geneticamente modificadas surgem como alternativa às quimioterapias e combinações de quimio-imunoterapias convencionais. Além de promover uma resposta antígeno específica, a terapia utilizando linfócitos CAR T reduz a possibilidade de um escape imunológico das células tumorais pela perda de expressão de antígenos tumorais. Por ser uma resposta independente de TCR, a ação dos linfócitos CAR T também está menos sujeita a estímulos tolerogênicos que possam se desenvolver no microambiente tumoral ou em órgãos linfoides secundários. No entanto, a expressão de antígenos reconhecidos por linfócitos CAR T em células não neoplásicas resalta um problema dessa terapia, com o surgimento de eventos adversos decorrentes dessa resposta “*on-target off-site*”, por exemplo neuro edema e aplasia de células B (PARKER; MIGLIORINI; PERKEY; YOST *et al.*, 2020). Além disso, uma barreira importante no uso clínico da terapia CAR T é o custo associado aos vetores virais que promovem a transformação dos linfócitos. Como forma de reduzir esse impacto e tentar tornar a terapia CAR T mais acessível, outras metodologias para transformação desses linfócitos devem ser pesquisadas e otimizadas, como o uso de LNPs.

2.1.2. Vacinas para câncer

Outra abordagem para ativar células imunes a reconhecer antígenos tumorais, porém sem a necessidade de transplante, são as vacinas terapêuticas. Nessa classe de imunoterapia, antígenos tumorais são expressos por células apresentadoras de antígenos (APCs) que, por sua vez, os apresentam para células T e induzem sua ativação. Assim, as células efetoras passam a reconhecer o antígeno de interesse em células tumorais, controlando o crescimento do tumor (RILEY; JUNE; LANGER; MITCHELL, 2019).

Dentre as plataformas de vacinas terapêuticas se destacam as vacinas de células dendríticas e de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Nas vacinas de células dendríticas, essas células são derivadas dos pacientes e modificadas *ex vivo* para expressarem antígenos tumorais. Em 2010 uma vacina de células dendríticas foi aprovada para terapia de câncer de próstata resistente a castração (Sipuleucel-T) (KANTOFF; HIGANO; SHORE; BERGER *et al.*, 2010). Apesar dos bons resultados da Sipuleucel-T, outras vacinas de células dendríticas falharam nos estudos clínicos devido à baixa eficácia (KANTOFF; HIGANO; SHORE; BERGER *et al.*, 2010).

Plataformas de vacinas utilizando ácidos nucleicos surgem como uma alternativa aos métodos convencionais de vacinas, e permitem o desenvolvimento de tratamentos personalizados para tumores (**Figura 5**) (PARDI; HOGAN; PORTER; WEISSMAN, 2018; WALDMAN; FRITZ; LENARDO, 2020). Nessas plataformas, a entrega de DNA ou RNA é direcionada para as APCs, induzindo a ativação de células T contra neo-antígenos ou contra antígenos tumorais de forma terapêutica ou profilática (CHEN; YE; HUANG; QIU *et al.*, 2022; LI; GOEDEGEBUURE; GILLANDERS, 2017; PARDI; HOGAN; PORTER; WEISSMAN, 2018).

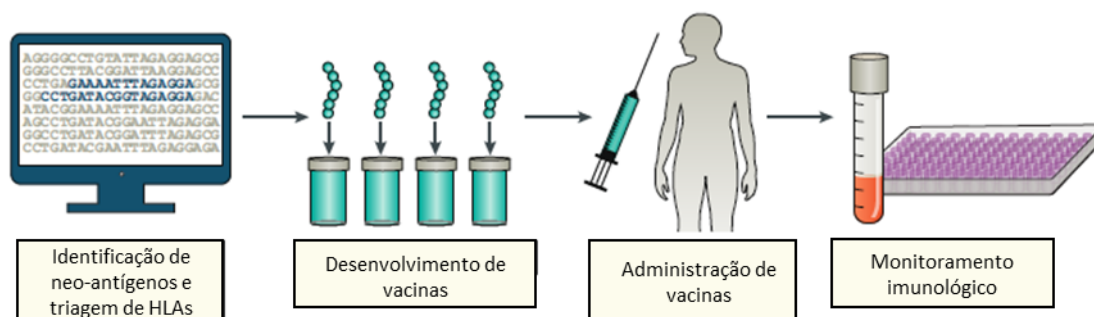


Figura 5: Representação esquemática do desenvolvimento de vacina personalizada contra câncer. Adaptado de Waldman et al., 2020 (WALDMAN; FRITZ; LENARDO, 2020).

Vacinas de DNA demonstraram pouca eficácia em testes clínicos, principalmente devido a imunogenicidade e dificuldades em ultrapassar as barreiras nucleares (LIU, 2019). Uma alternativa é utilizar RNA para induzir a expressão de antígenos em APCs, de forma análoga ao que vêm sendo feito com as vacinas para COVID-19 (HUANG; KON; HAN; ZHANG *et al.*, 2022; SWINGLE; HAMILTON; MITCHELL, 2021). Comparado ao DNA, o RNA é uma molécula simples de ser sintetizada e não se integra ao genoma das células (HUANG; KONG; ZHANG; CAO *et al.*, 2022). No entanto, o RNA exógeno é extremamente sensível à endonucleases presentes na circulação e não é internalizado pelas células alvo de forma passiva. Além disso, seu reconhecimento por sensores endossomais leva a uma resposta exacerbada, com produção de interferon do tipo I e outras citocinas pro inflamatórias (HUANG; KONG; ZHANG; CAO *et al.*, 2022).

A resposta contra RNAs exógenos pode ser minimizada utilizando RNAs sintetizados por transcrição *in vitro* (IVT) com bases modificadas (KARIKÓ; BUCKSTEIN; NI; WEISSMAN, 2005). Para melhorar sua resposta *in vivo*, essas moléculas devem ser protegidas das endonucleases para aumentar seu tempo de circulação e serem entregues de forma eficaz nas células alvo. Dessa forma, vacinas terapêuticas utilizando RNA vêm sendo desenvolvidas com plataformas de nanopartículas lipídicas ionizáveis (CHEN; YE; HUANG; QIU *et al.*, 2022; SONG; MUSETTI; HUANG, 2017).

2.2. Tumores hematológicos

Os tumores hematológicos são neoplasias derivadas de linhagens celulares hematopoiéticas e são classificadas levando em conta a linhagem da célula de origem e a velocidade de desenvolvimento clínico (SILVA, 2020). Dentre as neoplasias derivadas de progenitores de linfócitos, temos as leucemias linfocíticas, sendo as de maior destaque a leucemia linfocítica aguda (LLA) e a leucemia linfocítica crônica (LLC). A LLC é a leucemia mais comum na população adulta, e representa cerca de 25% dos casos de leucemia no ocidente (STRATI; JAIN; O'BRIEN, 2018). A LLA, entretanto, é mais comum na população jovem, com 60% dos casos acometendo pessoas abaixo dos 20 anos (JABBOUR; O'BRIEN; KONOPLEVA; KANTARJIAN, 2015).

O diagnóstico da LLC e da LLA leva em conta alguns achados clínicos (classificações de Rai e Binet (STRATI; JAIN; O'BRIEN, 2018)), mas também alguns marcadores genéticos que podem ser incluídos na tomada de decisão quanto à terapia a ser utilizada (GOMES; EVANGELISTA; SOUSA; ARAUJO *et al.*, 2017; HERISHANU; PÉREZ-

GALÁN; LIU; BIANCOTTO *et al.*, 2011). Pacientes com LLC apresentam contagens elevadas de linfócitos ($> 5 \times 10^3$ linfócitos/ μL), sendo identificados também no esfregaço como células pequenas com características de linfócitos maduros, citoplasma escasso e núcleo denso. Além disso, as células neoplásicas, em sua maioria, co-expressam marcadores de superfície de células B como CD5, CD19, CD20 e CD23 (RAWSTRON; KREUZER; SOOSAPILLA; SPACEK *et al.*, 2018). Além de auxiliar no diagnóstico, a imunofenotipagem das células neoplásicas pode indicar também alvos a serem explorados na imunoterapia com células adotivas ou anticorpos monoclonais.

O manejo clínico de pacientes com LLC é realizado de forma observacional (denominado “*watch-and-wait*”), sendo necessárias intervenções farmacológicas apenas nas formas ativas da doença, dependendo da idade e do estado físico do paciente (BURGER; O'BRIEN, 2018). Em casos de pacientes refratários a terapias, é utilizado o Venetoclax (inibidor de *Bcl-2*) associado ao Rituximab (SEYMOUR; KIPPS; EICHHORST; HILLMEN *et al.*, 2018). Na linha das imunoterapias com anticorpos monoclonais para LLC são utilizados, além do Rituximab, o Ofatumumab e o Obnutuzumab, ambos anti-CD20 (GOEDE; FISCHER; BUSCH; ENGELKE *et al.*, 2014; PAWLUCZKOWYCZ; BEURSKENS; BEUM; LINDORFER *et al.*, 2009). Como última linha de tratamento, em pacientes refratários, podem ser utilizadas células CAR T anti-CD19, com estudos indicando uma resposta de 74% e remissão completa de 21% (TURTLE; HAY; HANAFI; LI *et al.*, 2017).

A terapia com células CAR T foi aprovada para o tratamento de linfoma de células B em 2017 pelo FDA (LIU; CHEN; HAN; ZHANG, 2017; MAUDE; FREY; SHAW; APLENC *et al.*, 2014). No Brasil, existem 4 produtos registrados para terapia de tumores hematológicos com células CAR T, o Carvykti (mieloma múltiplo), o Kymriah (LLA de células B e linfoma difuso de grandes células B), o Yescarta (linfoma de grandes células B) e, mais recentemente, o Tecartus (LLA e linfoma de células do manto) (ANVISA, 2020; 2022a; b; 2023). Essas aprovações recentes apontam a importância dessa terapia no manejo de tumores hematológicos, ressaltando a necessidade de se desenvolver um produto nacional que possibilite o uso amplo dessa terapia, sobrecarregando menos o sistema de saúde.

2.3. Tumores sólidos

Devido a sua alta incidência, variedade de classificações e impacto na saúde pública, os tumores sólidos despertam grande interesse em pesquisas clínicas e de base. A estimativa do INCA para o triênio de 2023 a 2025 aponta que o câncer de mama, nas mulheres, e o de próstata, nos homens, serão os mais incidentes no Brasil. Além desses, outros tumores sólidos figuram na lista dos 10 mais incidentes na população brasileira, destacando também o câncer de cólon e reto como o segundo de maior incidência independente do sexo (INCA, 2023).

Um aspecto dos tumores sólidos que aumenta sua complexidade é a composição do microambiente tumoral (TME) que se forma no tecido durante sua progressão (BAGHBAN; ROSHANGAR; JAHANBAN-ESFAHLAN; SEIDI *et al.*, 2020). Esse microambiente é composto por células neoplásicas, células estromais, vasos sanguíneos e componentes de matriz extracelular que, em conjunto, dificultam a entrega de terapias e o infiltrado de células imunes (JIN; JIN, 2020; LUO; YAO; LI; FANG *et al.*, 2022). A presença de vasos sanguíneos irregulares e a alta densidade da matriz extracelular no TME também dificultam a entrega de imunoterápicos, como inibidores de checkpoint imunológico e células adotivas (por exemplo células CAR T) (JAIN; SKELTON IV; POND; NAQVI *et al.*, 2021; LUO; YAO; LI; FANG *et al.*, 2022).

Como uma alternativa para superar a dificuldade de entrega no TME, algumas pesquisas investigam a entrega por injeção direta no tumor para controlar seu crescimento, seja de células CAR T, peptídeos associados a fármacos ou mRNA encapsulado em nanopartículas lipídicas (CARPENITO; MILONE; HASSAN; SIMONET *et al.*, 2009; LIU; ZHANG; ZHANG; YAN *et al.*, 2022; YI; LIU; SUN; DU *et al.*, 2023). Uma outra abordagem auxiliar à terapia de tumores sólidos é utilizar fármacos capazes de modular as características físicas do TME (JAIN; SKELTON IV; POND; NAQVI *et al.*, 2021; ZHANG; PEI; ZHOU; XIE *et al.*, 2023). A utilização dessas moléculas induz uma normalização dos vasos sanguíneos e reduz a tensão causada pela matriz extracelular densa do TME, dessa forma favorecendo o infiltrado de células imunes, além de reduzir a imunossupressão característica desse microambiente (BOUCHER; POSADA; SUBUDHI; KUMAR *et al.*, 2023; KUBLI; BERGER; ARAUJO; SIU *et al.*, 2021).

Apesar das diferentes alternativas terapêuticas para tumores sólidos, a terapia CAR T não tem tanto destaque nesse contexto quanto na terapia de tumores hematológicos. Existem estudos clínicos para células CAR T, porém não há produtos aprovados para o tratamento de tumores sólidos (GUZMAN; REED; BIELAMOWICZ; KOSS *et al.*, 2023). Fatores intrínsecos aos tumores sólidos contribuem para o baixo sucesso das células CAR T. Por exemplo, o TME é extremamente hostil contra as células adotivas infiltrantes, pela densidade da matriz extracelular, pela presença de células e citocinas imunossupressoras e pelo estado de hipóxia que dificultam a atividade efetora dessas células (KORELL; BERGER; MAUS, 2022). Além disso, tumores sólidos são altamente heterogêneos tanto pela dinâmica clonal das populações de células neoplásicas, quanto pela expressão de antígenos que pode variar entre os tumores (GARRIDO; APTSIAURI, 2019; REEVES; KANDYBA; HARRIS; DEL ROSARIO *et al.*, 2018).

A escolha de um alvo para o desenvolvimento de células CAR T específicas para certos tipos de tumores sólidos também é um fator crítico para essa terapia (GUZMAN; REED; BIELAMOWICZ; KOSS *et al.*, 2023). Muitos marcadores identificados em células neoplásicas são compartilhados por células não neoplásicas, sendo esse um agravante inclusive em terapias CAR T para tumores hematológicos (PARKER; MIGLIORINI; PERKEY; YOST *et al.*, 2020; WAGNER; FRITSCHKE; PULSIPHER; AHMED *et al.*, 2021). Alguns estudos clínicos utilizam o mesmo alvo para direcionar células CAR T para diferentes tumores, como o EGFR e membros dessa família de receptores (SCHAFT, 2020). Outros alvos vêm sendo explorados em estudos clínicos para diferentes tipos de tumores sólidos (**Tabela 3**) (ASMAMAW DEJENIE; TIRUNEH; DESSIE TEREFE; TADELE ADMASU *et al.*, 2022).

Tabela 3: Estudos clínicos utilizando células CAR T para tumores sólidos

Número do estudo	Alvo	Indicações	Fase	Referência (DOI)
NCT03500991	HER2	Tumores do sistema nervoso central	Fase 1	10.1038/s41591-021-01404-8
NCT03618381	EGFR806	Tumores sólidos avançados	Fase 1	Recrutando/não publicado
NCT03525782	MUC1/PD-1	Câncer de pulmão de células não-pequenas	Fase 1/2	Recrutando/não publicado
NCT03198052	PSCA/MUC1/TGFβ, HER2/Mesotelin, Lewis- Y/GPC3/AXL/EGFR, CLDN18.2/B7H3	Câncer de pulmão	Fase 1	Recrutando/não publicado
NCT04099797	GD2	Câncer de cérebro	Fase 1	Recrutando/não publicado
NCT02932956	GPC3	Câncer de fígado	Fase 1	Ativo/não recrutando
NCT01583686	Mesotelin	Câncer de ovário, cervical, pancreático e de pulmão	Fase 1/2	Recrutando/não publicado
NCT02349724	CEA	Câncer de pulmão, colorretal, gástrico, de mama e pancreático	Fase 1	Recrutando/não publicado
NCT04483778	B7H3, CD19	Tumores sólidos avançados	Fase 1	Recrutando/não publicado
NCT04025216	TnMUC1	Tumores sólidos avançados refratários	Fase 1	Ativo/não recrutando

Adaptado de Asmamaw *et al.*, 2022 (ASMAMAW DEJENIE; TIRUNEH; DESSIE TEREFE; TADELE ADMASU *et al.*, 2022).

No entanto, alguns eventos adversos podem ser explicados por respostas “*on-target off tumor*” causada pelo reconhecimento desses antígenos em células saudáveis (EDELIN; HOUOT; MARABELLE; ALCANTARA, 2021). Dessa forma, é necessário estudar alvos mais específicos para células CAR T que sejam expressos por células neoplásicas, mas que as diferenciem de forma clara das células não neoplásicas.

2.3.2. Claudina como alvo de imunoterapias para tumores sólidos

Na busca por antígenos tumorais específicos, uma proteína de adesão denominada Claudinas tem despertado interesse. As diferentes isoformas da Claudina contribuem para a formação de *tight junctions* e estão envolvidas no controle da permeabilidade paracelular (OTANI; FURUSE, 2020). De forma interessante, a expressão dessas isoformas varia de acordo com o tecido e com o estado de diferenciação das células (VONNIESSEN; TABARIÈS; SIEGEL, 2024). Além de controlarem a permeabilidade em alguns tecidos, as Claudinas auxiliam na manutenção da polaridade celular e participam no processo de tumor gênese em alguns tecidos, sendo encontrada também em células circulantes em pacientes com câncer de mama (LI, 2021; WANG; ZHANG; DANIL; YANG *et al.*, 2022).

Por estarem envolvidas na progressão de alguns tumores, e serem expressas diferencialmente em alguns tecidos, as isoformas da Claudina estão sendo abordadas como alvos para terapia com anticorpos e com células CAR T em diferentes tumores (VONNIESSEN; TABARIÈS; SIEGEL, 2024). Uma das isoformas, a Claudina 6 (CLDN6), foi descrita por ser expressa em tecidos normais apenas em células embrionárias, mas apresenta uma alta expressão em tumores sólidos como câncer de ovário, carcinoma colorretal e de pulmão (QU; JIN; QUAN, 2021; TURKSEN; TROY, 2001). Atualmente, alguns estudos clínicos estão em andamento utilizando células adotivas (CAR T: NCT04503278; CAR TIL: NCT04842812; CAR NK NCT05410717) direcionadas contra CLDN6, demonstrando o interesse nesse alvo para imunoterapias “*off-the-shelf*” contra tumores sólidos (VONNIESSEN; TABARIÈS; SIEGEL, 2024).

Como forma de combinar uma vacina terapêutica à terapia com células CAR T, um estudo da BioNTech demonstrou, em modelo animal de xenoenxerto, que uma vacina de mRNA codificando para CLDN6 potencializou a eficácia de células CAR T direcionadas contra o mesmo antígeno (REINHARD; RENGSTL; OEHM; MICHEL *et al.*, 2020). Esse estudo demonstrou a eficácia da terapia em modelos de câncer de ovário, abrindo

perspectivas para outros tipos de tumores que expressem CLDN6. Além disso, o estudo associou a terapia CAR T à entrega de mRNA modificado utilizando um sistema nanoestruturado, abrindo novas possibilidades para a associação de terapias personalizadas utilizando essa tecnologia.

2.4. Nanopartículas lipídicas

Nanopartículas/nanomateriais, materiais com dimensão externa de 1 a 100 nm, já são utilizados há alguns anos na terapia antitumoral (SHI; KANTOFF; WOOSTER; FAROKHZAD, 2017). Esses materiais podem servir como sistemas de entrega de fármacos, aumentando a permeabilidade no microambiente tumoral e o tempo de circulação (GONG; SHEPPARD; BILLINGSLEY; JUNE *et al.*, 2021). A importância dessas nanopartículas é tão grande que atrai investimentos e sugere uma melhora significativa no tratamento de diversas doenças (MITCHELL; BILLINGSLEY; HALEY; WECHSLER *et al.*, 2021).

Dentre as classes de nanomateriais estão as nanopartículas lipídicas (LNPs). Existem subtipos de LNPs, mas essas são caracterizadas pelo formato esférico contendo pelo menos uma bicamada lipídica contornando um compartimento interno aquoso (MITCHELL; BILLINGSLEY; HALEY; WECHSLER *et al.*, 2021). Essas LNPs são amplamente utilizadas como sistemas de entrega por terem um processo produtivo pouco complexo, serem biocompatíveis, apresentarem boa biodistribuição (HUANG; KON; HAN; ZHANG *et al.*, 2022; SWINGLE; HAMILTON; MITCHELL, 2021) e pela facilidade em sua otimização dependendo da carga que se deseja entregar (FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2015). Além dessas características, as LNPs são capazes de suportar grandes cargas no seu interior, o que justifica sua utilização em terapias já aprovadas pela agência regulatória dos EUA (FDA) (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2019). Recentemente, devido a pandemia de COVID-19, plataformas de LNPs também foram amplamente utilizadas por empresas como Moderna e Pfizer na produção de vacinas de RNA mensageiro (mRNA) (HUANG; KON; HAN; ZHANG *et al.*, 2022; SWINGLE; HAMILTON; MITCHELL, 2021).

Com o avanço da tecnologia de entrega de ácidos nucleicos, novas plataformas de LNPs vêm sendo desenvolvidas. A entrega de mRNA para expressão gênica é a que mais se destacou recentemente pela produção das vacinas para COVID-19 (HUANG; KON; HAN; ZHANG *et al.*, 2022; SWINGLE; HAMILTON; MITCHELL, 2021). No entanto,

a entrega de RNA de silenciamento (siRNA) utilizando LNPs já é aprovada pelo FDA como uma terapia inovadora de edição gênica para doenças hereditárias (AKINC; MAIER; MANOHARAN; FITZGERALD *et al.*, 2019). Esses avanços tornam possível o desenvolvimento de novas plataformas utilizando DNA plasmidial (pDNA) que podem ser produzidas e comercializadas com um custo menor quando comparadas à tecnologia de mRNA. Nesse contexto, em 2023, nosso grupo desenvolveu uma vacina de DNA contra COVID-19 e demonstrou sua eficácia em modelos pré-clínicos (GUIMARAES; COSTA; SCALZO JUNIOR; FERREIRA *et al.*, 2024). O desenvolvimento dessas plataformas para entrega de ácidos nucleicos abre caminho para novas abordagens que necessitem dessa entrega intracelular de DNA, mRNA ou siRNA, como demonstrado na **Figura 6**.

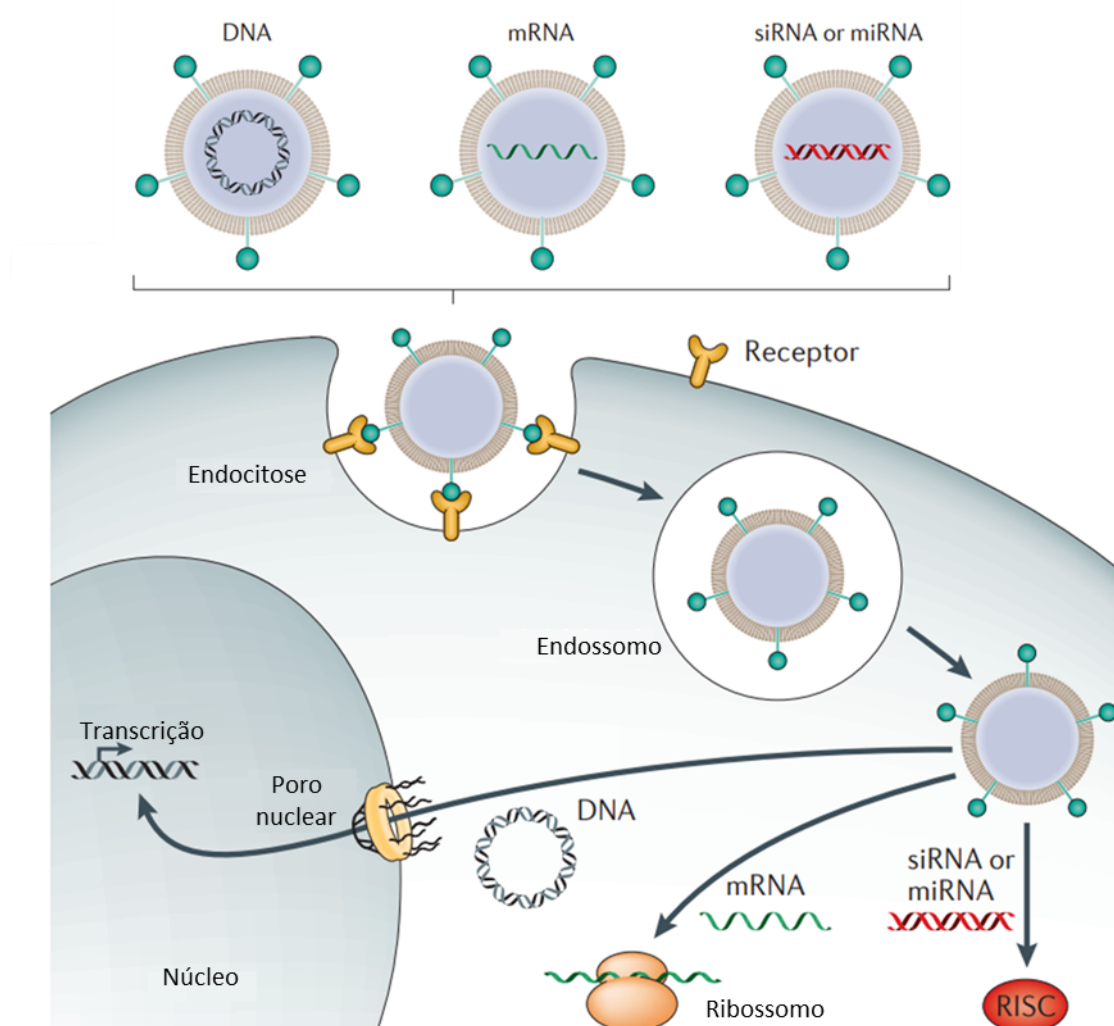


Figura 6: Processamento intracelular de LNPs carregando ácidos nucleicos. Adaptado de Yin et al., 2014 (YIN; KANASTY; ELTOUKHY; VEGAS *et al.*, 2014). LNPs

carreando diferentes tipos de ácidos nucleicos são endocitadas pelas células por interação via receptor e, no citoplasma, se forma o endossoma com a LNP em seu interior. Após o escape endossomal e desestabilização da LNP o ácido nucleico é liberado no citoplasma onde pode ser diretamente traduzido (mRNA), processado para silenciamento (siRNA) ou translocado para o núcleo para ser transcrito (DNA).

Para a formação desses sistemas de entrega são necessários alguns componentes principais, que podem ser alterados em sua proporção e/ou composição para otimizar as LNPs para alguma função ou alvo específicos. Lipídeos catiônicos ou ionizáveis são capazes de interagir eletrostaticamente com ácidos nucleicos, garantindo sua estabilidade e aumentando a eficiência da entrega dentro das células. Lipídeos auxiliares como DOPE têm uma estrutura que garante o formato esférico das LNPs, além de promover a liberação intracelular dos ácidos nucleicos. As LNPs também incluem colesterol como forma de melhorar a liberação intracelular e a estabilidade de formulações aplicadas *in vivo*. Por fim, a adição de um lipídeo associado a PEG (lipídeo PEGuilado) aumenta a estabilidade da LNP e o chamado “tempo de prateleira”, bem como previne a opsonização *in vivo* (CHENG; LEE, 2016).

Um ponto interessante do uso de LNPs é o fato de serem altamente customizáveis, favorecendo o direcionamento para órgãos alvo *in vivo* ou melhorando processos de transfecção *in vitro*. No entanto, algumas técnicas de síntese não se adequam muitas vezes à rapidez ou ao volume com que essas LNPs precisam ser produzidas. Como forma de contornar essa limitação, o uso de dispositivos microfluídicos vem sendo difundido, o que garante um maior controle das características físico-químicas das LNPs (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021). Simplificadamente, nesses dispositivos ocorre uma mistura caótica entre duas fases, uma etanólica e outra aquosa, em questão de milissegundos. Na fase etanólica, são diluídos os componentes lipídicos de interesse (lipídeos catiônico, auxiliar, PEGuilado e colesterol) enquanto, na fase aquosa, é diluído o nucleotídeo que se deseja encapsular (pDNA, mRNA ou outro). Variando a proporção dos componentes da fase lipídica, a razão entre o ácido nucléico e algum dos componentes ou o tipo de lipídeo obtêm-se uma gama de LNPs com características diferentes. Uma vantagem é que essa síntese é robusta, ou seja, LNPs feitas em diferentes momentos, mas com as mesmas proporções, mantêm suas características com pouca variação entre lotes. Algumas desvantagens são que solventes podem não ser compatíveis com o dispositivo

e, dependendo do volume a ser sintetizado, pode ser necessário usar outro tipo de dispositivo (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021).

2.5. Uso de DNA e mRNA na terapia CAR T

O uso de vetores integrativos, virais ou não-virais, no processo produtivo da terapia CAR T está associado ao desenvolvimento de diferentes efeitos adversos (CHICAYBAM; ABDON; VIEGAS; MARQUES *et al.*, 2020; WAGNER; FRITSCH; PULSIPHER; AHMED *et al.*, 2021). Nesse contexto, torna-se interessante a produção de células CAR T que expressam o receptor de forma transiente. O uso de LNPs para entrega de DNA ou mRNA surge como uma alternativa ao processo produtivo atual, possibilitando a expressão transiente de CAR com menos impactos na viabilidade das células transformadas (BILLINGSLEY; HAMILTON; MAI; PATEL *et al.*, 2022; BILLINGSLEY; SINGH; RAVIKUMAR; ZHANG *et al.*, 2020).

A entrega de DNA utilizando LNPs foi trabalhada pelo nosso grupo para expressar um CAR que reconhece CD19 em linfócitos humanos, e demonstramos a expressão transiente e ativação desses linfócitos *in vitro* (PRAZERES; FERREIRA; COSTA; DA SILVA *et al.*, 2023). Outra alternativa para expressão transiente de CAR é a utilização de mRNAs modificados produzidos por transcrição *in vitro* (IVT) (HUANG; KONG; ZHANG; CAO *et al.*, 2022). Apesar das limitações, células CAR T produzidas utilizando mRNA derivado de IVT tem demonstrado menos efeitos adversos, e vem sendo utilizadas em estudos pré-clínicos para tumores hematológicos e sólidos (LARSON; MAUS, 2021; MILIOTOU; PAPADOPOULOU, 2020; SOUNDARA RAJAN; GUGLIANDOLO; BRAMANTI; MAZZON, 2020; WIESINGER; MÄRZ; KUMMER; SCHULER *et al.*, 2019).

A entrega de mRNA por LNPs pode ser utilizada como auxiliar na terapia CAR T contra tumores sólidos, estimulando de forma eficiente as células CAR T a reconhecerem o antígeno tumoral (REINHARD; RENGSTL; OEHM; MICHEL *et al.*, 2020). Uma outra possibilidade criada pela tecnologia de LNPs é a entrega *in vivo* de mRNA para produção de células CAR T (BILLINGSLEY; GONG; MUKALEL; THATTE *et al.*). Decorando a superfície das LNP com anticorpos específicos para células T, é possível direcionar sua entrega especificamente para essas células, possibilitando sua transformação *in vivo* (TOMBÁČZ; LACZKÓ; SHAHNAWAZ; MURAMATSU *et al.*, 2021). Além disso, a expressão transiente de CAR aliada à transformação *in vivo* de linfócitos possibilitou o

uso dessa terapia em patologias cardíacas (RURIK; TOMBÁ CZ; YADEGARI; MÉNDEZ FERNÁNDEZ *et al.*, 2022), demonstrando a importância do desenvolvimento dessa tecnologia para futuras aplicações como, por exemplo, doenças autoimunes (MOUGIAKAKOS; KRÖNKE; VÖLKL; KRETSCHMANN *et al.*, 2021).

Apesar de promissora, a utilização de mRNA exógeno, sintetizado por IVT, apresenta vantagens e desvantagens. Desde a década de 1970 o uso de mRNAs desperta interesse no desenvolvimento de vacinas e outras aplicações (HOU; ZAKS; LANGER; DONG, 2021). Com os avanços na tecnologia de produção e plataformas de entrega de mRNA, temos atualmente aplicações como a vacina para COVID-19 (HUANG; KON; HAN; ZHANG *et al.*, 2022; HUANG; KONG; ZHANG; CAO *et al.*, 2022). Uma vez estabelecidos os métodos de produção, as perspectivas para aplicação dessa tecnologia são ampliadas, impulsionando a pesquisa básica e clínica na busca por terapias avançadas e personalizadas.

2.6. Testes *in vitro* para transfecção e funcionalidade de células CAR T

Uma vez sintetizadas essas LNPs, é necessário avaliar sua atividade biológica, seja *in vitro* ou *in vivo*. A literatura ressalta que, geralmente, a atividade *in vitro* de uma LNP não tem uma relação direta com sua atividade *in vivo*. Isso ocorre, pois os processos envolvidos na chegada da LNP à célula alvo e interações com proteínas são diferentes nas duas condições (CHENG; LEE, 2016). No entanto, trabalhos que mostram a atividade dessas LNPs transformando linfócitos CAR T *in vitro* e *in vivo* contribuem para a otimização dessa terapia (BILLINGSLEY; HAMILTON; MAI; PATEL *et al.*, 2022; BILLINGSLEY; SINGH; RAVIKUMAR; ZHANG *et al.*, 2020; REINHARD; RENGSTL; OEHM; MICHEL *et al.*, 2020).

Para testar uma variedade de LNPs, bem como diferentes construções de CAR, é necessária uma metodologia eficiente, rápida e prática. Conforme essa necessidade, Bloemberg e colaboradores desenvolveram um protocolo para triagem rápida de diferentes construtos de DNA pra CAR (BLOEMBERG; NGUYEN; MACLEAN; ZAFER *et al.*, 2020). Nesse protocolo, são utilizadas células Jurkat (linfócito T humano imortalizado proveniente de um paciente com LLA) que, apesar de não produzirem todo o repertório de citocinas de um linfócito normal, produzem IL-2 e expressam marcadores de ativação como modelo de transfecção (INOUE; SWAIN; NAKANISHI; SUGIYAMA, 2014; PAWELEC; BOROWITZ; KRAMMER; WERNET, 1982; SCHNEIDER;

SCHWENK; BORNKAMM, 1977). Células Jurkat transfectadas são então co-cultivadas com células alvo que expressam o antígeno reconhecido pelo CAR ou, como controle, células alvo que não expressam esse antígeno. A prova de conceito é feita co-cultivando células expressando CAR com linhagens tumorais imortalizadas, tendo como controle células Jurkat transfectadas com um plasmídeo reporter (expressando apenas fluorescência). O parâmetro avaliado nesse experimento é o nível de expressão do marcador de ativação CD69 nas células Jurkat expressando CAR, demonstrando, mesmo que de forma limitada, sua característica efetora (DUONG; WESTWOOD; YONG; MURPHY *et al.*, 2013).

Por fim, os avanços na utilização de nanomateriais permitiu o desenvolvimento de tecnologias inovadoras na terapia antitumoral. As LNPs, como produto desse avanço, vêm sendo aplicadas em diferentes contextos tanto *in vitro* como *in vivo*. Essas LNPs são ferramentas importantes na entrega de ácidos nucleicos, abrindo novos horizontes para terapias de edição gênica de células *in vitro*. A síntese de LNPs utilizando dispositivos microfluídicos possibilita a produção de uma gama de LNPs com diferentes características de forma robusta. Métodos de triagem *in vitro* possibilitam uma avaliação segura e rápida da atividade dessas LNPs. Finalmente, estudos que avaliam a ativação de linfócitos CAR T podem ser feitos, inicialmente, utilizando células Jurkat, otimizando a escolha do construto ou do método de transfecção.

3. JUSTIFICATIVA

Com o aumento da incidência de diferentes tipos de câncer, é necessário desenvolver novas abordagens terapêuticas, mais específicas, personalizadas e eficazes. Nesse contexto, a terapia com células CAR T desponta como possibilidade de se tratar tumores hematológicos, mas ainda encontra barreiras em sua aplicação contra tumores sólidos. Além disso, o processo produtivo de células CAR T utiliza vetores integrativos, que estão associados ao desenvolvimento de efeitos adversos nos pacientes e ao elevado custo de produção. Uma proposta para otimizar o processo produtivo, e ampliar a aplicação da terapia CAR T é a entrega de construtos não integrativos (DNA ou mRNA) utilizando plataformas de LNPs. Essas plataformas podem ser modificadas para entrega direcionada de ácidos nucleicos em tipos celulares específicos, e abrem perspectivas para aplicação em imunoterapias antitumorais.

4. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi desenvolver uma plataforma de LNPs para entrega de ácidos nucleicos (DNA e mRNA) para células imunes, visando sua aplicação na imunoterapia utilizando células CAR T e desenvolvimento de vacina contra tumores.

Os objetivos específicos desse trabalho serão descritos separadamente, mas englobam:

- a) Otimizar uma nanopartícula lipídica ionizável, a partir de uma biblioteca de formulações, capaz de entregar pDNA para linfócitos T e produzir células CAR T reconhecendo CD19.
- b) Utilizar a nanopartícula lipídica ionizável otimizada para a produção de células CAR T contra tumores sólidos utilizando mRNA sintetizado por IVT.
- c) Funcionalizar a LNP otimizada para entrega específica de mRNA para células CD11b⁺ e testar sua eficácia como vacina terapêutica em modelo animal.

5. METODOLOGIA

5.1. Síntese e caracterização de LNPs

Uma biblioteca de LNPs foi formulada conforme metodologia já estabelecida no grupo de pesquisa (GUIMARAES; ZHANG; SPEKTOR; TAN *et al.*, 2019). Foi utilizado o lipídeo ionizável C12-200 para otimizar a transfecção e fuga endossomal. As LNPs foram então combinadas em proporções predeterminadas, com um fosfolipídio, como 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), para suportar estruturas de bicamada; colesterol para otimizar a estabilidade da bicamada; e um lipídeo associado ao PEG (C14-2000) para evitar a absorção inespecífica. O conjunto de lipídeos foi misturado com a sequência de DNA ou mRNA de interesse em um dispositivo de chip micro fluídico. DNA e lipídeo ionizável (C12-200) foram utilizados nas formulações em uma razão de 10:1. Seringas conectadas a um chip micro fluídico induziram a mistura caótica da fase etanólica (contendo lipídeos) e da fase aquosa (contendo DNA) em diferentes proporções, produzindo as nanopartículas pelo encapsulamento do DNA via interação eletrostática. As LNPs resultantes foram então dialisadas contra PBS em um cassete de 20.000 MWCO a temperatura ambiente por 2 horas e esterilizadas por filtração em filtro de seringa com poro de 0,22 µm. O tamanho das LNPs e o potencial zeta foram determinados usando a técnica de espalhamento dinâmico da luz e as concentrações de DNA determinadas utilizando NanoDrop. Para a triagem das LNPs e otimização da

transfecção foram sintetizadas LNPs (LNP-GN1) carregando pDNA que codifica para uma proteína fluorescente verde (ZsGreen) (**Figura 7A**). Utilizando proporções semelhantes de lipídeos, foram sintetizadas LNP-CAR, carregando pDNA que codifica para um CAR de 2ª geração, tendo CD19 como alvo, 4-1BB como domínio co-estimulatório e a proteína eGFP como reporter fluorescente (**Figura 7B**). Para sintetizar LNPs carregando mRNA foi utilizado 35% de C12-200 e a razão de 10:1 de mRNA para lipídeo ionizável. Estudos *in vitro* para expressão de CAR-CLDN6 foram feitos com mRNA produzido por IVT (procedimento descrito no tópico “Síntese de mRNA por IVT”). Nos experimentos *in vivo* foi utilizado o mRNA-OVA modificado com pseudouridina comprado da empresa Trilink.

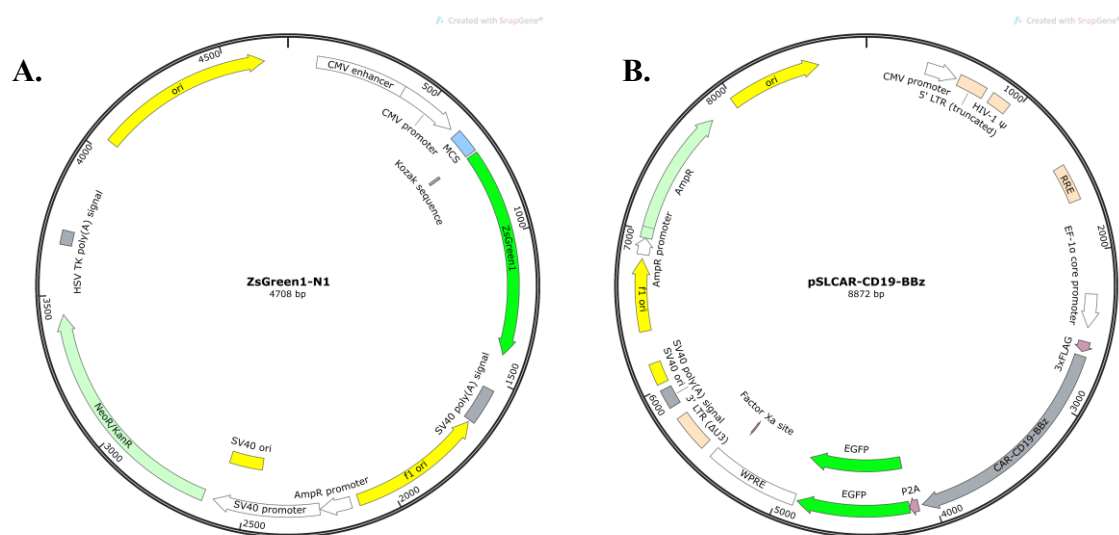


Figura 7: Mapa dos plasmídeos utilizados para transfecção com pDNA. A. Plasmídeo com pDNA para GN1 (Addgene no. 54702). **B.** Plasmídeo com pDNA para CAR-CD19BBz (Addgene no. 135992).

5.1.2. Preparação de LNPs com lipídeos comerciais

Os lipídeos SM-102, ALC-0315 e D-Lin-MC3-DMA foram utilizados para preparar LNPs encapsulando pDNA que codifica para ZsGreen a fim de comparar a transfecção dessas formulações com a formulação sintetizada com o lipídeo C12-200. A síntese e caracterização dessas LNPs foi realizada seguindo o método descrito no item anterior. Os lipídeos SM-102, ALC-0315 e D-Lin-MC3-DMA foram adicionados à formulação na mesma razão molar que o C12-200 (35%) e na mesma razão com DNA (10:1).

5.1.3. Preparação de LNPs com PEG modificado e funcionalização com anticorpo

Para funcionalização de LNPs, o PEG C14-2000 foi substituído por um PEG C18-2000 contendo um grupo maleimida (PEG-Mal) com a mesma razão molar na formulação (2,5%). A síntese e caracterização das LNPs contendo PEG-Mal foi realizada seguindo o método descrito no item anterior.

Seguindo a funcionalização da LNP, o anticorpo anti-CD11b foi tiolado com excesso de reagente de Traut (12 vezes) em PBS-EDTA (pH 8,00) por 45 minutos a 25 °C. O produto da reação foi passado por uma coluna de dessalinização (Zeba spin column) centrifugando a coluna a 1000 g por 2 minutos à temperatura ambiente. Foram coletadas 3 eluições e a concentração de IgG em cada eluição foi determinada por NanoDrop. O reagente de Traut reage com aminas primárias (-NH₂) presentes nos resíduos de aminoácidos do anticorpo, substituindo por um grupo tiol (-SH) (**Figura 8A**). Uma vez tiolado, o anticorpo foi incubado em excesso (40 vezes) com a LNP contendo PEG-Mal por 4 horas a 25 °C, se ligando por *click chemistry* aos grupos maleimida presentes na superfície da LNP (**Figura 8B**) (CAO; JIANG; LEVY; HUGHES *et al.*, 2018).

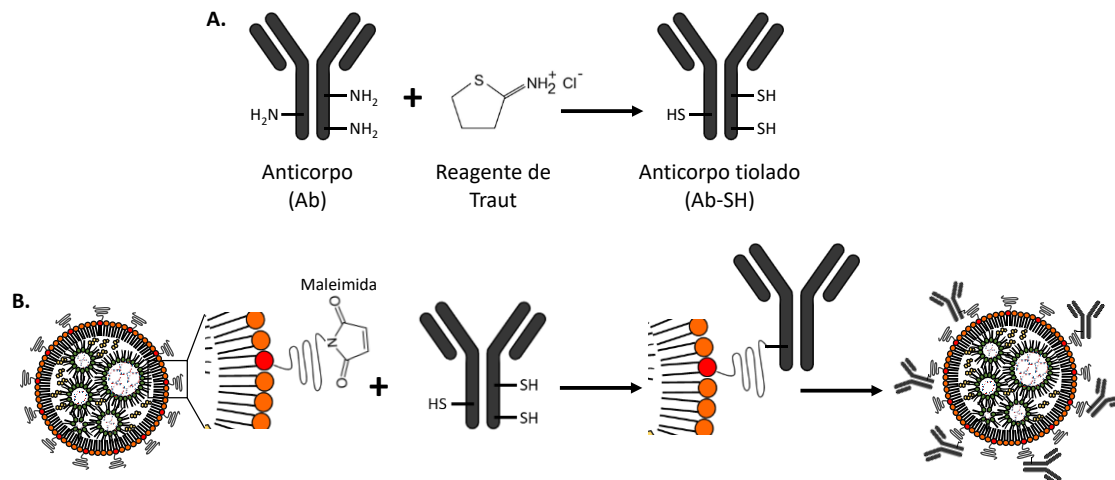


Figura 8: Tiolação de anticorpo e funcionalização de LNP. **A.** Representação esquemática da reação do anticorpo com o reagente de Traut, ressaltando a presença das aminas primárias (-NH₂) e sua substituição por grupos tiol (-SH). **B.** Representação do grupo maleimida ligado ao PEG na superfície da LNP reagindo com um anticorpo tiolado (esquerda). A ligação covalente por *click chemistry* promove a funcionalização da LNP (direita).

Passado o tempo de reação do anticorpo com a LNP, o produto foi filtrado em filtro de centrífuga (Amicon) com *cutoff* de 100 kDa. Essa filtração elimina o excesso de anticorpo que não se ligou às LNPs, além de concentrar a formulação para usos futuros. A LNP funcionalizada com anticorpo foi caracterizada por DLS para determinação do tamanho, PDI e potencial zeta.

Para verificar a presença de anticorpos na superfície da nanopartícula, uma alíquota (2 µL) da LNP funcionalizada ou não foram incubados com beads de compensação de citometria com afinidade para anticorpos feitos em rato ou camundongo. Em seguida foi adicionado 0,5 µL de estreptavidina APC à mistura (**Tabela 2**) e as beads foram adquiridas no citômetro LSR Fortessa com os parâmetros de tamanho e complexidade adequados.

5.1.4. Análise de pKa aparente

Para analisar o pKa aparente das LNPs utilizamos o ensaio de TNS como descrito anteriormente (SCALZO; SANTOS; FERREIRA; COSTA *et al.*, 2022). Para este ensaio, foi utilizado um tampão contendo NaH₂PO₄ (20 mM), citrato de sódio (25 mM), acetato de sódio (20 mM) e NaCl (150 mM) e o pH foi ajustado em alíquotas para se obter 18 valores de pH variando entre 2 e 13 com incrementos de aproximadamente 0,5. O tampão, nos diferentes pHs, foi plaqueado em placas opacas de 96 poços. As LNPs foram alíquotadas e diluídas em água ultrapura, e 10 µL das LNPs foram adicionados a 180 µL do tampão em cada valor de pH, em duplicata. Em seguida, 10 µL da sonda 6-(*p*-Toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid sodium salt (TNS) foram adicionados aos poços a uma concentração final de 3 µg/mL. A fluorescência foi detectada imediatamente utilizando o equipamento Cytation com um comprimento de onda de excitação de 325 nm e de emissão de 435 nm. O sinal detectado é proveniente da interação do TNS com cargas positivas da formulação (lipídeo ionizável), e diminui com o aumento do pH do meio. O pKa é determinado como o valor de pH em que se tem metade das espécies de lipídeo ionizável em sua forma ionizada, e foi determinado utilizando o cálculo de IC50 (curva dose x resposta) no GraphPad Prism v9.

5.1.5. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada utilizando o Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific) como descrito anteriormente (AU - EL-MAYTA; AU - PADILLA; AU - BILLINGSLEY; AU - HAN *et al.*, 2023). Para determinar a quantidade

de DNA não encapsulado (C_{TE}), a LNP foi diluída em TE e adicionada à solução de trabalho do Qubit. A quantidade total de DNA na LNP (C_{TX} , encapsulado e livre) foi determinada diluindo a LNP em TE + 1% Triton X-100, e adicionando a LNP aberta à solução de trabalho do Qubit. A eficiência de encapsulação (EE%) foi então determinada pela fórmula: $EE\% = [(C_{TX}) - (C_{TE}) / (C_{TX})] * 100$.

5.2. Síntese de mRNA por *in vitro* transcription (IVT)

Como template de DNA para IVT foi utilizado o plasmídeo pmRVac-antihCLDN6-hBBzCAR sintetizado pela empresa VectorBuilder. A sequência de um receptor CAR de segunda geração baseado em um anticorpo monoclonal anti-CLDN6 (REINHARD; RENGSTL; OEHM; MICHEL *et al.*, 2020) foi clonada no esqueleto pmRVac (propriedade intelectual da VectorBuilder). Esse esqueleto possui em sua estrutura: sequências 5' e 3' UTR otimizadas e validadas pela empresa; a sequência do promotor T7; uma cauda poly-A de 110 nucleotídeos; gene de resistência a Kanamicina para seleção de bactérias transformadas; e um sítio para enzimas de restrição (NotI e SapI) após a cauda poly-A (**Figura 9**).

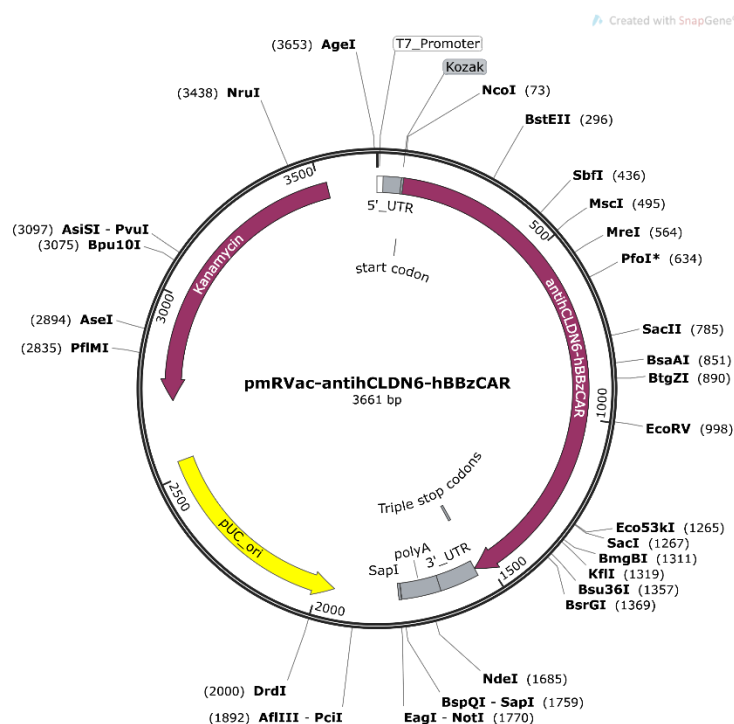


Figura 9: Mapa do plasmídeo utilizado para IVT.

O plasmídeo foi linearizado com a enzima NotI, o produto da digestão foi separado em gel de agarose e a banda correspondente foi extraída do gel utilizando o kit da Zymo

DNA Recovery kit. Em seguida, 500 ng de DNA linearizado foram adicionados ao mix de reação do MEGAscript™ T7 Transcription Kit (ThermoFisher) utilizando as bases sem modificação (mRNA não modificado) ou substituindo o UTP por pseudouridina (mRNA ψ UTP). A reação de IVT foi incubada a 37 °C por 24 horas e, em seguida, tratada com DnaseI por 30 minutos a 37 °C. O produto da IVT foi purificado utilizando o Rneasy kit (Qiagen) e quantificado por NanoDrop. Depois de purificado, o mRNA foi desnaturado a 65 °C por 5 minutos e foi adicionado o Cap0 utilizando os reagentes da New England Biolabs. O mRNA “cappeado” foi purificado utilizando o Zymo RNA recovery kit, quantificado por Nanodrop e uma alíquota (~750 ng) foi separada em gel de agarose para avaliar a integridade e o tamanho do mRNA sintetizado. O mRNA “cappeado” foi encapsulado em LNPs conforme descrito no tópico “Síntese e caracterização de LNPs”.

5.3. Linhagens celulares e experimentos de transfecção e captação *in vitro*

Como modelo de linfócitos humanos imortalizados foi utilizada a linhagem Jurkat (leucemia linfocítica aguda – LLA) comprada diretamente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Como modelo de célula alvo CD19⁺ foi utilizada a linhagem Raji (linfoma de Burkitt), doada por colaboradores da FioCruz-Rio e INCA. Como modelo de célula alvo CLDN6⁺ foi utilizada a linhagem Colo-205 (adenocarcinoma colorretal), adquirida da ATCC. Para avaliação de eficácia da vacina terapêutica, foi utilizada a linhagem B16F10-OVA (melanoma murino) expressando o antígeno ovalbumina, doada pela professora Renata Meirelles da UFRJ. Para estudo de captação de LNPs funcionalizadas, foram utilizadas células JawsII (células dendríticas imaturas derivadas de camundongo) adquiridas do BCRJ. As células foram mantidas em meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina; Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 10 mM de HEPES (Sigma) e 1 mM de piruvato de sódio (Sigma). Células JawsII foram mantidas em meio alpha-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) e 1 U/mL de GM-CSF. As células de suspensão (Jurkat e Raji) foram mantidas em garrafas T75 a uma densidade máxima de 1x10⁶ células/mL. As células de cultura mista ou aderentes (Colo-205, B16F10-OVA e JawsII) foram tripsinizadas a cada 3 dias ou quando atingiam a confluência de 70%. Todas as culturas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C. Para testes de transfecção, células

Jurkat foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 60.000 células por poço.

5.3.2. Avaliação da transfecção de LNPs em células Jurkat

Para avaliação da expressão de fluorescência e viabilidade celular *in vitro*, células Jurkat foram tratadas com LNP-GN1 e analisadas por citometria de fluxo. Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (Sarsted), e imediatamente tratadas com LNP-GN1 carreando quantidades pré-determinadas de pDNA. As células transfectadas foram coletadas três dias após a transfecção, centrifugadas (400 xg, 5 minutos, 4 °C) e ressuspensas em PBS contendo 0,5 µg/mL de iodeto de propídeo (PI) e adquiridas em citômetro de fluxo FACS Calibur. Dessa forma, selecionamos apenas células vivas (PI⁻) que expressam a fluorescência verde (ZsGreen⁺). Células que não receberam LNP-GN1 foram utilizadas como controle. Os mesmos parâmetros foram utilizados para determinar a transfecção de células Jurkat com as LNP-CAR.

5.3.3. Controles positivos de transfecção

Como métodos alternativos de transfecção sem utilização de vetores virais, foram utilizadas a Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) e a Nucleofecção. Para transfecção com Lipofectamina, as células foram plaqueadas em meio OPTmem a uma densidade de 60.000 células por poço em placa de 96 poços. Separadamente, foram combinados o reagente Lipofectamina 2000 e pDNA em meio OPTmem, incubados à temperatura ambiente por 20 minutos e posteriormente adicionados aos poços. As células foram incubadas com o complexo por 4 horas, coletadas e centrifugadas (1200 RPM, 4 °C, 7 minutos). O pellet foi ressuspendido em meio RPMI completo, as células foram contadas e novamente plaqueadas a uma densidade de 60.000 células por poço em placa de 96 poços. Para transfecção por Nucleofecção, células Jurkat foram coletadas, lavadas e ressuspensas com OPTmem. Depois de contadas a concentração de células foi ajustada para 1×10^7 células/mL e 100 µL dessa suspensão, contendo 1×10^6 células, foram transferidos para cubetas de eletroporação. Foi adicionado 1 µg de pDNA à suspensão de células e imediatamente realizada a eletroporação utilizando o aparelho Amaxa® Nucleofector® II Device (Lonza) com programação pré-definida (X-001). Após a eletroporação, as células foram coletadas com meio RPMI completo e centrifugadas (1200 RPM, 4 °C, 7 minutos). O pellet foi ressuspendido em meio RPMI completo, as

células contadas e novamente plaqueadas a uma densidade de 60.000 células por poço em placa de 96 poços. Depois de transfectadas as células foram incubadas por 3 dias e posteriormente coletadas para análise por citometria de fluxo.

5.3.4. Captação de LNPs funcionalizadas com anticorpo

Para avaliar a captação de LNPs encapsulando mRNA para OVA, células JawsII foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 100.000 células/poço. LNPs funcionalizadas com anti-CD11b (CD11b-LNP-OVA) ou não funcionalizadas (LNP-OVA) foram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente, com a sonda fluorescente DiD. As LNPs marcadas com a sonda foram adicionadas às células JawsII e as imagens de fluorescência foram capturadas após 30 minutos, 1 e 4 horas. As imagens foram obtidas com o equipamento Cytation 5 Cell Imaging system da Biotek no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI-UFMG), utilizando uma objetiva de 10x e um filtro de 633 nm. Para quantificar a fluorescência do DiD as imagens de fluorescência foram convertidas em uma escala de cinza de 8-bit e normalizadas utilizando um limiar de fluorescência de células que não receberam LNPs. A média da intensidade dos pixels determinada acima desse limiar foi medida e representada graficamente.

5.4. Amostras humanas e aspectos éticos

5.4.1. Aspectos éticos da pesquisa

O sangue de doadores saudáveis (HDs) foi coletado após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – **Anexo I**). A aprovação dos aspectos éticos e protocolo dessa pesquisa foram aprovados pelo COEP (número CAAE 02177612.0.0000.5149).

5.4.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue de HDs foi diluído em PBS 1x para um volume de 30 mL e adicionado delicadamente a um tubo contendo 15 mL de Ficoll Hypaque (GE). As amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 1400 rpm a 20 °C em rotor de ângulo móvel. O plasma foi coletado, aliquoteado e congelado em freezer -80. A camada de PBMC (interfase entre as camadas de plasma e Ficoll) foi coletada e transferida para um tubo de 50 mL. As células foram mantidas em gelo e lavadas por três vezes com meio RPMI a 300 g por 10 minutos e sua concentração celular determinada após contagem em câmara de Neubauer.

5.4.3. Purificação e transformação de linfócitos T

Linfócitos T foram separados por colunas magnéticas de seleção negativa, com aproximadamente 90% de pureza e viabilidade (ThermoFisher). Para geração de linfócitos CAR T, as células foram previamente estimuladas com ativador de linfócitos T CD3/CD28 Dynabeads (ThermoFisher) na proporção de 1 bead para 2 células e com 100 UI/mL de IL-2 humana recombinante (rhIL-2). Após três dias de ativação com as beads, as células foram tratadas com LNPs carreando DNA para expressão de CAR-CD19 ou carreando mRNA para expressão de CAR-CLDN6. A eficiência transfecção com DNA foi avaliada 3 dias após a adição de LNPs e a eficiência de transfecção com mRNA foi avaliada após 24 horas.

5.8. Experimentos funcionais utilizando células Jurkat

Os experimentos de co-cultura foram realizados para avaliar a ativação de linfócitos transfectados com LNP-CAR quando desafiados com células alvo, adaptando um protocolo estabelecido por Bloemberg e colaboradores (BLOEMBERG; NGUYEN; MACLEAN; ZAFER *et al.*, 2020). Células Jurkat foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 400.000 células por poço, transfectadas com LNPs e mantidas em cultura por 3 dias (CAR-CD19) ou por 24 horas (CAR-CLDN6). Passado esse tempo, as células transfectadas foram coletadas, centrifugadas e contadas em câmara de Neubauer. Paralelamente, células alvo (Raji, CD19⁺ ou Colo-205, CLDN6⁺) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Células Jurkat transfectadas foram adicionadas às células alvo em diferentes quantidades a fim de obter diferentes razões “Efetoras:Alvo” (E:A). Após 24 horas em co-cultivo, as células foram marcadas com marcador de viabilidade, um mix para identificar células alvo (CD19) e células efetoras (CD4) e marcadores de ativação nas células efetoras (PD-1 e CD69). Os anticorpos utilizados nos experimentos funcionais estão listados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Anticorpos para proteínas de superfície humanas e marcadores de viabilidade

Marcador	Fluorocromo	Clone	Referência	Marca
CD3	SuperBright 645	OKT3	64-0037-42	ThermoFisher
CD8	eFluor 450	RPA-T8	48-0088-42	ThermoFisher
CD4	SuperBright 600	RPA-T4	63-0049-42	ThermoFisher
CD19	PE	HIB19	12-0199-42	ThermoFisher
CD69	APC-eFluor 780	FN50	47-0699-42	ThermoFisher
PD-1	PE-Cy7	eBio J105 (J105)	25-2799-42	ThermoFisher
7AAD	PerCP	-	00-6993-50	ThermoFisher
Annexin V	APC	-	17-8007-72	ThermoFisher
Live/Dead	Acqua	-	L34966	ThermoFisher
Flag	Biotinilado	OT14C5	TA150015	OriGene

5.6. Experimentos funcionais utilizando linfócitos CAR T

Para avaliar a eficácia de linfócitos CAR T transfectados com DNA para CAR-CD19, os linfócitos foram coletados 3 dias após a transfecção e co-cultivados em diferentes razões E:A com células Raji, por 24 horas. Passado esse tempo, as células foram marcadas com anticorpos para identificar as células efetoras (CD3), células alvo (CD19) e com Anexina V e 7AAD para determinação da morte específica de células alvo. As aquisições de todos os experimentos envolvendo citometria de fluxo foram realizadas na Faculdade de Farmácia da UFMG utilizando um LSR Fortessa (BD) e as análises serão feitas utilizando o software *FlowJo 10* (BD). Os anticorpos e marcadores utilizados nos experimentos funcionais estão listados na **Tabela 4**.

Para avaliar a eficácia de linfócitos CAR T transfectados com mRNA para CAR-CLDN6, células Colo-205 foram marcadas com Calceína-AM e plaqueadas em placas de 96 poços. Linfócitos CAR T foram adicionados à cultura 24 horas após a transfecção, e a fluorescência do marcador Calceína-AM foi determinada com o equipamento Cytation 5 Cell Imaging system da Biotek no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI-UFMG), utilizando uma objetiva de 10x e um filtro de 488 nm.

5.7. Experimentos *in vivo*

Os experimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) pelo número de protocolo 269/2022. Foram utilizados animais C57Bl/6 de ambos os sexos com idade entre 6 e 7 semanas (5 animais por grupo). No dia 0 os animais receberam, via intravenosa (i.v.), uma dose (*prime*) de 5 µg de mRNA-OVA encapsulado em LNPs funcionalizadas com anti-CD11b (CD11b-LNP-OVA) ou não funcionalizadas (LNP-OVA). Após 5 dias os animais receberam um

boost com a mesma dose de mRNA-OVA. Tanto no *prime* quanto no *boost*, animais controle receberam um volume de PBS estéril equivalente ao volume de LNP recebido pelos animais tratados.

Uma semana depois do *boost*, 1×10^6 células B16F10-OVA foram injetadas via subcutânea (s.c.) em um volume de 100 μ L no flanco direito dos animais. Os animais foram acompanhados por 21 dias para sinais de sofrimento e perda de peso, e eutanasiados quando algum desses sinais fosse observado. Após 21 dias, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina e xilasina e o sangue foi coletado por punção cardíaca para coleta de soro, que foi aliquotado e armazenado em freezer -80. O baço dos animais foi coletado em ambiente estéril para citometria. O tumor foi coletado, pesado e clivado em fragmentos para fixação em paraformaldeído 2% tamponado e para congelamento rápido em nitrogênio líquido para futuras análises.

5.7.1. Cultura de esplenócitos, estímulo *in vitro*

Os baços dos animais foram coletados em RPMI completo (suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico) e dissociados mecanicamente utilizando um *cell strainer* de 40 μ m. As células dissociadas foram centrifugadas (1400 RPM, 4 °C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O pellet foi lisado com 9 mL de água estéril por 10 segundos e imediatamente foi adicionado 1 mL de PBS 10x estéril. Após a lise, a suspensão de células foi centrifugada (1400 RPM, 4 °C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de RPMI completo e as células foram contadas. Os esplenócitos foram plaqueados a uma densidade de 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços com fundo em U em um volume de 100 μ L. As células foram estimuladas com o 100 μ g (em um volume de 50 μ L) do peptídeo OVA diluído em RPMI estéril e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 6 horas. Passado o tempo de incubação inicial, foi adicionada Brefeldina aos poços, e as células foram incubadas por mais 8 horas na presença desse reagente. Ao término da incubação, as células foram marcadas para análise por citometria de fluxo.

5.7.2. Citometria de fluxo para análise de esplenócitos

Após a incubação, as células foram lavadas com PBS centrifugando a placa a 1400 RPM por 10 minutos a 4 °C para remover proteínas do soro, e incubadas com o marcador de viabilidade celular *Live/Dead* seguindo as instruções do fabricante. A suspensão celular foi marcada com dois painéis com anticorpos para identificar 1) células T,

ativação, produção de citocinas e fator de transcrição; e 2) células mieloides, expressão de MHC-II e produção de citocinas. A incubação com anticorpos de superfície foi realizada por 20 minutos à temperatura ambiente em tampão FACS (PBS + 2% SFB). As células foram lavadas adicionando tampão FACS e centrifugando a placa por 5 minutos a 1400 RPM. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando os tampões do kit *Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer*, de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez permeabilizadas, as células foram marcadas com anticorpos para avaliação da produção de citocinas e fatores de transcrição. Para o painel de identificação de células mieloides, as células foram incubadas com estreptavidina por 15 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em tampão *Perm/Wash* e adquiridas no citômetro LSR Fortessa. Para análise dos dados foi utilizado o *FlowJo* 10.

O painel para avaliação de células T era composto pelos marcadores de superfície: anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD44; e pelos anticorpos para citocinas: anti-IL-17, anti-IL-10, anti-IFN γ e fator de transcrição anti-FoxP3. O painel para células mieloides era composto por anti-CD45, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-Gr1, anti-F4/80, anti-CD206, anti-MHC-II para marcação de superfície; e pelos anticorpos de marcação intracelular para citocinas anti-TNF α , anti-iNOS e anti-IL-10. Foram utilizados anticorpos conjugados a fluorocromos ou biotinilados previamente titulados pelo nosso grupo. As identificações dos anticorpos, catálogo, clone e fluorocromo estão listados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Anticorpos para proteínas murinas, streptavidina e marcador de viabilidade

Marcador	Fluorocromo	Clone	Referência	Marca
CD45	Pacific Orange	30-F11	MCD4530	ThermoFisher
CD3	APC	17A2	17-0032-82	ThermoFisher
CD4	PE-Cy7	GK1.5	25-0041-82	ThermoFisher
CD8	eFluor 450	53-6.7	48-0081-82	ThermoFisher
CD44	SuperBright 600	IM7	63-0441-82	ThermoFisher
CD11b	SuperBright 600	N418	64-0114-82	ThermoFisher
CD11c	SuperBright 645	M1/70	63-0112-82	ThermoFisher
GR-1	Biotinilado	RB6-8C5	108404	BioLegend
F4/80	PE-Cy7	BM8	25-4801-82	ThermoFisher
MHC II	APC-eFluor 780	M5/114.5.2	47-5321-82	ThermoFisher
IL-17	PE-eFluor610	eBio17B7	61-7177-82	ThermoFisher
IL-10	AlexaFluor 700	JES5-16E3	56-7101-82	ThermoFisher
IFN γ	APC-eFluor 780	XMG1.2	47-7311-82	ThermoFisher
Foxp3	PE	150D/E4	12-4774-42	ThermoFisher
TNF α	eFluor 450	MP6-XT22	48-7321-82	ThermoFisher
iNOS	PE-eFluor610	CXNFT	61-5920-82	ThermoFisher
Streptavidina	APC	-	405207	BioLegend
Live/Dead	Acqua	-	L34966	ThermoFisher

5.8. Análise estatística

Os dados foram plotados como média $\pm$ desvio padrão (SD) e analisados utilizando o software GraphPad Prism v9 utilizando teste *t*, one-way ou two-way ANOVA, como indicado na legenda de cada resultado. Foi utilizado como valor de significância $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Capítulo 1 – Produção de linfócitos CAR T anti-CD19 utilizando LNPs carreando DNA

O objetivo geral dessa sessão do projeto foi **“Otimizar uma LNP, a partir de uma biblioteca de formulações, capaz de entregar pDNA para linfócitos T e produzir células CAR T reconhecendo CD19”**. Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Projetar uma biblioteca de LNPs (LNP-GN1) para a entrega de pDNA que codifica a proteína fluorescente verde (ZsGreen) em linfócitos humanos imortalizados (Jurkat);
- Avaliar a viabilidade celular e cinética de expressão de CAR anti-CD19 de 2ª geração (denominado CAR-CD19-BBz), com padronização de tempo e concentração de pDNA;
- Projetar uma biblioteca de LNPs (LNP-CAR) para a entrega de pDNA que codifica para CAR-CD19-BBz, e selecionar as melhores formulações;
- Avaliar a ativação de células Jurkat transfectadas com as melhores formulações para expressão de CAR-CD19-BBz, quando co-cultivadas com células Raji (CD19⁺);
- Isolar células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doadores humanos saudáveis e purificar a população de linfócitos;
- Transfectar linfócitos humanos primários com LNP-CAR, gerando linfócitos CAR T;
- Avaliar a expressão de CAR-CD19-BBz em linfócitos CAR T após a transfecção;
- Avaliar a atividade citotóxica e ativação de linfócitos CAR T in vitro quando co-cultivados com células Raji;

Os resultados desse trabalho culminaram no pedido de patente BR1020230120431 (**Anexo X**), foram publicados na revista *International Journal of Nanomedicine* (Fator de impacto: 8,0. Qualis A1) com o título “Delivery of plasmid DNA by ionizable lipid

nanoparticles to induce CAR expression in T cells” e serão apresentados na forma do manuscrito a seguir:

Ionizable lipid nanoparticle-mediated delivery of plasmid DNA for CAR T cell engineering

Pedro Henrique Dias Moura Prazeres^{1,2}, Heloísa Ferreira², Pedro Augusto Carvalho Costa², Walison da Silva², Marco Túlio Alves², Marshall Padilla³, Ajay Thatte³, Anderson Kenedy Santos^{4,5}, Anderson O. Lobo⁶, Adriano Sabino⁷, Helen Lima Del Puerto¹, Michael J. Mitchell³, Pedro Pires Goulart Guimarães^{1,2#}

¹ Department of Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

² Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Department of Bioengineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

⁴ Department of Pediatrics/Gastroenterology and Hepatology, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA

⁵ Department of Genetics, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA

⁶ Department of Materials Engineering, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

⁷ Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

#Corresponding author: Pedro Pires Goulart Guimarães. Email address: ppiresgo@reitoria.ufmg.br Address information: Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Chimeric antigen receptor (CAR) cell therapy represents a hallmark in cancer immunotherapy. However, the most commonly used methods to transduce CAR in T cells are integrative and associated with severe adverse effects. Ionizable lipid nanoparticles (LNPs) can be optimized to engineer T cells with transient expression of CAR.

Methods: Here, we screened a mini-library of LNPs for the expression of an anti-CD19 CAR (CAR-CD19BBz) in T cells. LNPs were characterized and screened for transfection

using Jurkat cells. The optimized formulation was used to generate CAR T cells from human primary T cells and their killing potential was assessed *in vitro*.

Results: By varying the molar ratios of excipient lipids, we optimized an LNP to engineer T cells for the expression of CAR. Using Jurkat cells as model T cells, we show that LNP-mediated pDNA delivery induced a transient expression of CAR-CD19BBz in these cells. CAR expressing Jurkat cells underwent activation when co-plated with Raji (CD19⁺) cells in a manner dependent on the effector-to-target ratio. Using our optimized LNP, we also generated functional primary human CAR T cells, with significant specific killing of CD19⁺ cells.

Conclusion: Collectively, our results show that LNP-mediated delivery of pDNA is a suitable method to produce functional CAR T cells, which holds promise for improving the production methods and broader application of this therapy in the future.

Keywords: Lipid nanoparticles, pDNA delivery, CAR T cells, Cell engineering, Cancer immunotherapy

INTRODUCTION

Immunotherapy, using T cells expressing the chimeric antigen receptor (CAR) targeting CD19, has been approved since 2017 by the FDA for the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL)^{1,2}, and later for large B-cell lymphoma (BCL)³ and multiple myeloma (MM)^{4,5}. Due to the high remission rates obtained by this treatment, CAR T cells are a useful and efficient approach for the treatment of hematologic cancers^{6,7}. Despite its specificity, they are still inaccessible to many patients due to the high cost of available treatments, such as Axicabtagene ciloleucel (Yescarta, Gilead)⁸ and Tisagenlecleucel-T (Kymriah, Novartis)⁹. The associated costs of this therapy are especially troublesome in developing countries, such as Brazil, where the costs of

treatment, hospital procedures, and diagnostics are financed by the public healthcare system for a total of R\$ 3.5 billion¹⁰.

Viral vectors are the most used vector to transduce CAR in T cells, but their production requires expensive quality controls, trained personnel, and a production facility that is difficult to scale up, which, when combined, restricts the broad application of CAR T cell therapy^{8,11}. Another bottleneck is the time required for the activation, engineering, and expansion of CAR T cells, which can take up to 22 days for Axicabtagene ciloleucel⁸. This extensive *ex vivo* culturing procedure influences the phenotype of CAR T cells, which in turn may affect their ability to engraft and be effective upon reinfusion to patients¹². Furthermore, viral transfection systems are associated with immunogenicity against CAR T cells and B cell aplasia due to constitutive expression of CAR in effector cells^{13,14}. These adverse effects are limitations associated to the production method of CAR T cells. However, investigations on the response of CAR T cells are ongoing, with durable responses against refractory multiple myeloma¹⁵ and several solid tumors¹⁶. Taken together, this indicates that CAR T cells will be largely applied in the future, requiring novel production methods that are easy to scale-up and less time and lower cost for production in accordance with the safety and effectiveness profile required by this therapy.

Non-viral delivery methods have been studied for the production of CAR T cells. Reports using transposon-transposase systems delivered by electroporation have shown promising results in pre-clinical mouse models of leukemia^{17,18}. Although this strategy aims at maintaining T cells in culture for shorter periods, it still uses an integrative system, which is related to adverse effects observed due to the long-term expression of CAR¹⁹⁻²¹. Chemical agents such as polyethylenimine (PEI) and poly(2-dimethylamino) ethyl methacrylate (PDMAEMA) can be used as non-viral delivery methods to T cells, despite

the difficulties in DNA uptake by primary T cells. Additionally, this method severely impacts cell viability, as also observed after electroporation²².

As an alternative to viral vectors or electroporation methods to produce CAR T cells, nanomaterials such as ionizable lipid nanoparticles (LNPs) have been explored as they form systems that protect nucleic acids from nucleases and facilitate intracellular delivery^{23,24}. In contrast with viral vectors, LNPs can be rapidly optimized, do not require complex production plants, accommodate different cargos, and are able to scale up^{25,26}. Compared to other non-viral methods, such as polymeric nanosystems, LNPs are more clinically applicable, with approved products that efficiently deliver mRNA and interference RNA to different cell types *in vivo*²⁷⁻²⁹. Using LNPs also overcomes common barriers of viral vectors, since there are fewer limitations to the amount of genetic material that can be delivered by this system³⁰. Previous reports from our group show the ability of LNPs formulated with C12-200 to transfect primary cardiomyocytes with DNA³¹ as well as their optimization potential for targeted *in vivo* delivery of both DNA and mRNA³². The delivery of mRNA by LNPs to T cells has recently been described. These observations confirm that LNPs can be optimized for the production of CAR T cells. More importantly, CAR T cells produced by this approach transiently express CAR, which is an important feature as a non-integrative system^{33,34}. Therefore, LNPs can be used as a platform for cellular immunotherapy, although their potential to deliver plasmid DNA (pDNA) to produce CAR T cells need further investigation.

In this context, we sought to evaluate the delivery of pDNA to T cells using LNPs. Thus, we synthesized and screened a mini-library of pDNA-loaded LNPs (**Fig. 1A and B**) and evaluated their transfection efficiency in Jurkat cells, an immortalized human T cell line (**Fig. 1C**). By varying the lipid ratios in each formulation, we identified a lead LNP that induced high expression of CAR in this cell line, with low toxicity when compared to

standard transfection methods. Further investigation revealed the activation of transfected Jurkat cells after co-plating with Raji cells (CD19⁺ Burkitt's lymphoma cell line). Additionally, specific killing was assessed after co-plating CAR T cells with CD19⁺ cells at different ratios, demonstrating the effectiveness of the transfected cells (**Fig. 1D**).

MATERIAL AND METHODS

Lipid nanoparticle (LNP) synthesis and characterization

To produce nanoparticles, an ethanolic phase containing ionizable lipids and excipients was mixed with an aqueous phase of pDNA in a customized microfluidic device made in house as previously described³⁵. Stock solutions of the ionizable lipid C12-200 (synthesized as previously described Love et al., 2010), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE, Avanti Polar Lipids), cholesterol (Avanti Polar Lipids), and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000] (ammonium salt) (C14-PEG 2000, Avanti Polar Lipids) (**Fig. S1, Supplementary Material**) were prepared in ethanol and mixed at predetermined molar ratios as shown in **Tables 1 and 2**. The aqueous phase containing the plasmid DNA of interest was prepared in 10 mM citrate buffer, pH 3.0 (Teknova). Both inlets were connected to programmable syringe pumps (Harvard Apparatus) and the solutions were injected into the inlet of the microfluidic devices at a 2.5:1 ratio. LNPs were collected and then dialyzed against PBS in a 20,000 MWCO dialysis cassette (Thermo Scientific) for 2h. Afterwards, the LNPs were passed through a 0.22 µm filter (Merck Millipore). LNPs were diluted in a PBS containing 1% Triton before quantification of dsDNA using NanoDrop (Thermo Scientific). Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific) was used to determine the encapsulation efficiency (EE) of the LNP-CAR library as described previously³⁶.

LNP hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI), and zeta potential were measured using a Zetasizer Nano ZS machine (Malvern Instrument). The structure analysis of the optimized LNP was performed via cryogenic-transmission electron microscopy (Cryo-TEM). Vitrified samples were examined using Tecnai G2-20 - FEI SuperTwin 200 kV at the Microscopy Center of UFMG. The apparent pKa of the optimized LNP was assessed by the 6-(p-Toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid sodium salt (TNS) binding assay as previously described³¹.

Cell culture

Jurkat cells (ATCC, TIB-152) were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ) and Raji cells (ATCC, CCL-86) were acquired by collaborators from Fiocruz-Rio and INCA. All cell lines were cultured in RPMI-164 supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, and 1 mM sodium pyruvate.

pDNA delivery to Jurkat cells

Jurkat cells were plated in triplicate in 96-well plates at a density of 6×10^4 cells/well in 100 μ L and treated with established doses of pDNA encapsulated in LNPs diluted in complete culture medium. As positive controls of transfection, Jurkat cells were treated with the same dose of pDNA using lipofectamine and electroporation. For lipofectamine transfection, pDNA was mixed with Lipofectamine2000 (Invitrogen) reagent in OptiMEM and incubated for 20 minutes at room temperature, as per manufacturer's instructions, before adding the mixture to the cells. For electroporation, 2×10^6 Jurkat cells were transferred to 2 mm cuvettes with 100 μ L of OptiMEM with the determined dose of pDNA. Cells were then electroporated using an Amaxa Nucleofector II Device (Lonza). Cells transfected with LNPs, Lipofectamine2000, or electroporation were incubated at 37

°C for 72 hours. Cells were then collected, centrifuged (400 xg, 5 minutes, 4 °C), and resuspended in PBS. The expression of CAR-CD19BBz in transfected cells was assessed by the enhanced green fluorescent protein (eGFP) present in the plasmid construct, as previously described^{37,38}. Briefly, this pDNA presents a P2A ribosomal skipping sequence separating the CAR-CD19BBz and eGFP sequences, allowing the detection of CAR-expressing cells without the need of additional markers³⁷. To exclude dead cells from the analysis, propidium iodide (PI) was added to the cell suspension at a concentration of 0,5 µg/mL immediately before acquisition in a FACS Calibur. The expression of ZsGreen or CAR-CD19BBz was carried out gating “live cells” determined as PI⁻.

Co-culture activation assays using Jurkat cells

Raji cells, a CD19⁺ Burkitt's lymphoma cell line, were co-plated with Jurkat cells transfected with different LNPs at a 1:1 effector-to-target ratio. After 24 hours, cells were collected and labeled with an antibody mix to determine effector cell activation and target cell death. Activation of CAR⁺ Jurkat cells was determined by CD69 and PD-1 mean fluorescence intensity (MFI). Similarly, Raji cells were plated at a density of 3x10⁴ cells /well and Jurkat cells transfected with either LNP-9-CAR or LNP-9-GN1 were plated at a serial dilution at varying effector-to-target ratios.

Primary human T cell isolation and pDNA delivery

Blood from healthy donors was collected after informed consent, in accordance with the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (COEP-UFMG) under the approval number 02177612.0.0000.5149. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected by centrifugation using a density gradient (Ficoll, GE). Primary T cells (CD3⁺) were purified from fresh PBMC using negative selection beads (Thermo

Scientific), then stimulated overnight with human T cell activator beads CD3/CD28 (Thermo Scientific) at a 1:3 bead to cell ratio. Stimulated T cells were expanded *in vitro* for 6 days by adding 100 U/mL of recombinant human IL-2 (rhIL-2). Following activation and *in vitro* expansion, T cells were transfected using the optimized LNP. Cells were periodically counted by Trypan Blue viability staining so the cell density did not exceed 1×10^6 cells/mL.

Co-culture killing assays using CAR T cells

CAR T cells were co-plated with Raji cells at varying effector-to-target ratios. Non-transfected T cells were co-plated at the same ratios as the controls. After 24 hours, cells were collected and labeled with surface markers to identify CD19⁺ cells and with the viability markers Annexin V and 7AAD (Thermo Scientific) as per manufacturer's instructions. Specific killing was expressed by the frequency of CD19⁺ cells positively labeled for both Annexin V and 7AAD.

Statistics

Data are expressed as mean $\pm$ SD. Analyses were performed using Prism 7 (GraphPad Software Inc). ANOVA tests followed by Bonferroni post-tests were applied for comparison of more than 2 groups. For analysis between 2 groups P values <0.05 indicate statistical significance.

RESULTS

Transfection potential of DNA-loaded LNPs

A mini-library of LNPs encapsulating a plasmid DNA (pDNA, Addgene no. 54702) encoding for ZsGreen (LNP-GN1) was synthesized using an ionizable lipid (C12-200) and a PEG-lipid conjugate (C14-PEG2000) at fixed molar ratios, and phospholipid (DOPE) and cholesterol at varying ratios (**Table 1; Fig. S2A, Supplementary**

Material)³¹. These LNPs were added to Jurkat cells and the frequency and viability of ZsGreen expressing cells was assessed after 3 days by flow cytometry (**Fig. S2B, Supplementary Material**). Our LNPs were characterized by size, polydispersity index (PDI), and zeta potential (**Fig. S2C and D, Supplementary Material**). Although, all LNPs induced ZsGreen expression in Jurkat cells, LNP-5-GN1 performed better than the other formulations without affecting cell viability (**Fig. S2E and F, Supplementary Material**). Electroporation and Lipofectamine2000, were used as controls. The controls induced higher cytotoxicity compared to treatment with LNPs (**Fig. S2E and F, Supplementary Material**). The lead formulation LNP-5-GN1 also induced higher ZsGreen expression, as measured by mean fluorescence intensity (MFI) in Jurkat cells (**Fig. S2G, Supplementary Material**). Furthermore, it was found that increased DOPE molar ratio in the LNP formulation improved transfection efficiency in Jurkat cells (**Fig. S2H, Supplementary Material**). Next, we sought to analyze how the lead formulation LNP-5 would perform delivering pDNA in Jurkat cells for the expression of CAR.

LNP screening for pDNA-CAR-CD19BBz expression in Jurkat cells

We encapsulated a pDNA encoding for a second-generation CAR targeting CD19 (CAR-CD19BBz, Addgene no. 135992) in our lead formulation LNP-5 (LNP-5-CAR). Jurkat cells were treated with different amounts of pDNA, and the expression of CAR-CD19BBz was assessed after 3 days by flow cytometry (**Fig. 2A**). We determined that the optimal pDNA concentration for transfection of Jurkat cells was 420 ng of pDNA per 60,000 cells (**Fig. 2B**). Cell viability was not affected after treatment with LNP-5-CAR at different concentrations (**Fig. 2C**). We then evaluated the expression of CAR for up to 12 days using 420 ng of pDNA per 60,000 cells, as a means to assess the CAR expression over time. We found higher CAR-CD19BBz expression 3 days after transfection with the LNP-5-CAR, and from day 6 onwards the frequency of cells expressing CAR decreases

significantly (**Fig. 2D**). In addition, we observed a slight decrease in cell viability along the culture period, despite cell viability being maintained above 90% at all timepoints analyzed (**Fig. 2E**).

To optimize our lead formulation, we formulated a new library of pDNA-CAR LNPs varying the molar ratios of DOPE and cholesterol, and screened these formulations using Jurkat cells (**Table 2; Fig. 3A and B**). The hydrodynamic diameter of all LNPs ranged from 99.15 to 129.80 nm with PDI values ranging from 0.06 to 0.22 and slightly negative or neutral zeta potential (**Fig. 3C and D**). As assessed by cryo-TEM, LNPs showed spherical morphology with an electron dense core (**Fig. 3E**). Our screen on Jurkat cells identified four top-performing LNPs, which induced higher frequency of cells expressing CAR-CD19BBz when compared to non-transfected control, Electroporation and Lipofectamine2000 (**Fig. 3F**). When analyzing the effects of the variations of DOPE and Cholesterol in the LNPs, we found improved transfection with increased molar ratios of DOPE (35% to 42.5%), associated with reduced molar ratios of Cholesterol (30% to 20%) (**Fig. S3A and B, Supplementary Material**). These formulations showed over 80% of encapsulation efficiency (Table 2). TNS assay showed a pKa of 7.45 for LNP-5-CAR, 7.54 for LNP-7-CAR, 7.42 for LNP-9-CAR and 7.47 for LNP-11-CAR (**Fig. S4A, B, C and D, Supplementary Material**). Importantly, these top-performing LNPs induced enhanced CAR-CD19BBz expression compared to electroporation and Lipofectamine2000, with significantly reduced cytotoxicity (**Fig. 3G**). Expression of CAR-CD19BBz was similar after transfection with different LNPs, and was significantly higher than non-transfected cells and cells transfected by electroporation and Lipofectamine2000 (**Fig. 3H and I**). After determining the transfection efficiency, we sought to assess whether the expressed CAR was functional by evaluating the activation of transfected Jurkat cells.

Functional screening using top-performing formulations on Jurkat cells

We hypothesized that transfected Jurkat cells expressing CAR-CD19BBz recognize target cells in a co-culture model and upregulate the expression of activation markers such as CD69 and PD-1. This is a fast and easy method that allows high-throughput evaluation of different CAR constructs³⁷. Thus, we sought to evaluate whether our top-performing LNPs would generate functional CAR expressing Jurkat cells (**Fig. 4A**). After transfection with different LNPs, Jurkat cells were co-plated with Raji cells at a 1:1 or 1:0 ratio and the expression of activation markers was assessed by flow cytometry (**Fig. 4B and C**). Jurkat cells transfected with LNP-9-CAR showed higher levels of CD69 and PD-1 than cells transfected with the control formulation LNP-9-GN1(**Fig. 4D and E**). These markers were not upregulated in CAR-expressing Jurkat cells at a 1:0 ratio, indicating a specific activation of these cells (**Fig. 4D and E**).

We then analyzed whether the activation of Jurkat cells expressing CAR was dependent on the ratio between target and effector cells. After transfecting Jurkat cells with the optimized LNP-9-CAR or the control LNP-9-GN1 (**Fig. S5A and B, Supplementary Material**), we co-plated these cells with Raji cells at varying effector-to-target ratios. We demonstrated that Jurkat cells expressing CAR upregulate the expression of both CD69 and PD-1 in a ratio dependent manner (**Fig. 4F and G**). Thus, our LNP system was able to generate CAR expressing cells that properly respond to CD19⁺ target cells. Despite being a good model to analyze cell activation, Jurkat cells are not able to secrete all cytokines required to induce target cell death³⁷, which should be assessed with coculture models using human primary T cells.

LNP-mediated delivery of pDNA to primary human T cells

To assess the DNA delivery of our optimized formulation, human primary T cells were transfected with LNP-9-CAR, and the expression of CAR-CD19BBz was assessed by flow cytometry after 3 days (**Fig. 5A**). Our LNP system was able to transfect T cells without affecting cell viability (**Fig. 5B, C and D**). Additionally, both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were transfected by the LNP, with a higher frequency of CD4⁺ T cells expressing CAR-CD19BBz (**Fig. 5E and F**).

CAR T cells mediated specific killing of CD19⁺ cells

The effectiveness of T cells transfected by LNP-9-CAR was evaluated by co-plating CAR T cells or control non-transfected cells with CD19⁺ cells for 24 hours at varying effector-to-target ratios (**Fig. 5G**). Specific killing of CD19⁺ cells was determined by labeling the cells with Annexin V and 7AAD, and expressed as the frequency of double positive cells within the CD19⁺ population (**Fig. 5H**). Our results demonstrate that CAR T cells most effectively killed CD19⁺ cells at the highest effector-to-target ratio (5:1 and 2:1). Specific killing of target cells was still observed even at a 1:1 ratio, indicating the efficacy of CAR T cells engineered using LNPs (**Fig. 5I**).

DISCUSSION

Significant advances have been developed for CAR T cell therapy in terms of regulatory aspects, production methods, and application against different malignancies^{34,39,40}. Although durable remissions are induced by this therapy, long-term adverse effects such as B-cell aplasia¹⁴, cytokine release syndrome^{41,42}, and neurotoxicity⁴³ are commonly observed. One of the factors that contribute to the long-term adverse effects is the integration of the CAR construct to the genome of the T cells, which induces constitutive expression of CAR. Therefore, novel methodologies are needed to overcome the development of severe long-term adverse effects associated to CAR T cell therapy, as

well as to improve the manufacturing process, reducing the time and cost of the final product.

LNPs have been investigated as potential delivery methods for both DNA and mRNA. Recently, the potential of LNPs was demonstrated by their wide application in COVID-19 vaccines⁴⁴, as well as by their ability to transfect primary cells³¹, reassuring their potential in cell engineering. LNPs were also used to produce CAR T cells *in vitro*, with a screening showing the performance of different ionizable lipids in delivering mRNA to T cells and highlighting the importance of optimizing a formulation for T cell engineering^{33,34}.

In this study, LNPs were formulated and characterized focusing on the enhanced pDNA delivery to T cells. In all formulations the ionizable lipid to pDNA ratio was fixed in 10:1 and the molar ratios of two excipient lipids were varied. A primary screening showed that increasing the DOPE molar ratio favors the expression of ZsGreen in Jurkat cells, which are considered hard to transfect by non-viral methods⁴⁵. In this screening we identified a lead formulation named LNP-5, which induced a significantly higher frequency of transfected cells when compared to other formulations as well as to standard transfection methods such as electroporation and Lipofectamine.

Using the lead formulation, LNP-5, encapsulating a pDNA for the expression of CAR-CD19BBz, we showed enhanced frequency of CAR expressing cells 3 days after transfection. This system does not likely lead to incorporation of the CAR construct to the genome of the cell, since a significant reduction in the frequency of CAR expressing cells was observed after 9 days of culture with no effects on cell viability. Similar results have been achieved after transfection of Jurkat cells with mRNA encoding for Luciferase, wherein a peak was observed after 24 hours with significant reduction after 48 hours³⁴. The differences in mRNA and pDNA mediated expression rely not only in the delivery

method, but also in the intracellular processing of these molecules. For pDNA delivery, transcription only occurs after nuclear translocation of the construct, whereas mRNA is readily transcribed by the cellular machinery once its delivered into the cytoplasm²⁵. A second screening was performed to optimize our lead formulation, formulating new LNPs varying the molar ratios of excipient lipids. In addition to the LNP-5, three new formulations with high transfection efficiency were identified. These results highlighted that pDNA delivery can be improved by increasing the molar ratio of DOPE in the LNP. In fact, other studies using RNA loaded LNPs have reported that increasing DOPE percentages in the formulation, favors the *in vitro* transfection of Jurkat cells⁴⁶, as well as *in vivo* targeting and transfection of immune cells^{47,48}. However, formulations with more than 50% of DOPE do not perform as well in T cells.

Despite Jurkat cells being a good model to study T cells, their cytokine repertoire is limited⁴⁹. However, Jurkat cells expressing CAR upregulate the expression of activation markers, especially CD69, when co-plated with target cells. In a screening setting this serves as an indicator that the construct, or cell engineering method, is able to generate functional CAR expressing cells³⁷. By co-plating transfected Jurkat cells with CD19⁺ cells, we demonstrated that the activation of CAR expressing cells was significantly higher in cells transfected with our optimized formulation, LNP-9. Additionally, we showed that transfection with LNP-9 generated CAR expressing Jurkat cells that were activated in an effector-to-target ratio dependent manner.

In a short culture period (3 days) we were able to transfect T cells after *in vitro* activation. Our analysis shows that the majority of CAR expressing CD3⁺ cells were CD4⁺, despite also having CD8⁺ T cells also expressing CAR-CD19BBz. Some variability in transfection efficiency was observed across the four donors, which is expected even in the clinical setting⁵⁰. When co-plating these CAR T cells with CD19⁺ cells, we observed

higher specific killing in effector-to-target ratios with more effector cells. Specific killing was observed up to the 1:1 ratio, corroborating previous reports which show that higher numbers of target cells reduce specific killing induced by CAR T cells^{17,34,42}. The presence of a CD4⁺ CAR expressing T cell population has clinical importance, with reports showing a decade-long persistence of this subset⁵¹ and their participation in cytokine release syndrome and long-term responses⁵² after CAR T cell treatment. Though clinical trials and reports show that the CD4:CD8 ratio should be determined beforehand to induce better responses, each subset has their importance in the success of CAR T cell therapy for hematological malignancies^{53,54}.

Although *in vivo* studies are needed to determine the engraftment and efficacy of CAR T cells generated by LNP mediated pDNA delivery, our results suggest that this LNP platform can be used as a fast and non-toxic approach for T cell engineering. Further optimization may be performed based on our LNP-9 formulation opening ways for *in vivo* T cell targeted delivery as well as an alternative to producing CAR T cells with different constructs targeting solid tumors.

Conclusion

Our results demonstrated that we were able to optimize a formulation that significantly transfects primary T cells isolated from human donors. The transfected cells expressing CAR-CD19BBz displayed effector function when co-plated with a Burkitt's lymphoma cell line at different effector-to-target ratios. The transient expression of CAR-CD19BBz induced by our LNP system could be an interesting approach for CAR T cell immunotherapy, especially as it may reduce adverse effects, which should be further evaluated. Additionally, our results provide new venues for the production of CAR T cells using non-viral transfection methods and could be applied for the treatment of solid tumors and other diseases.

Author contributions

All authors made a significant contribution to the work reported, whether that is in the conception, study design, execution, acquisition of data, analysis and interpretation, or in all these areas; took part in drafting, revising or critically reviewing the article; gave final approval of the version to be published; have agreed on the journal to which the article has been submitted; and agree to be accountable for all aspects of the work.

Acknowledgements

This work was funded by National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (442731/2020-5; 305932/2022-5), PRPq-UFMG, CAPES (88887.506690/2020-00), FAPEMIG (APQ-00826-21; RED-00202-22 Rede de Pesquisa em Imunobiológicos e Biofármacos para terapias avançadas e inovadoras), Brazilian Ministry of Health – MoH, Brazilian National Programme of Genomics and Precision Health – Genomes Brazil, Decit/SCTIE/MS, DGITIS/SCTIE/MS. P.P.G.G. is supported by CNPq (442731/2020-5; 305932/2022-5) and FAPEMIG (APQ-00826-21).

References

1. Liu Y, Chen X, Han W, Zhang Y. Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia. *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)*. 2017;53(11):597-608.
2. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England journal of medicine*. 2014;371(16):1507-1517.
3. Roschewski M, Longo DL, Wilson WH. CAR T-Cell Therapy for Large B-Cell Lymphoma — Who, When, and How? *New England Journal of Medicine*. 2021;386(7):692-696.
4. Teoh PJ, Chng WJ. CAR T-cell therapy in multiple myeloma: more room for improvement. *Blood Cancer Journal*. 2021;11(4):84.
5. Rendo MJ, Joseph JJ, Phan LM, DeStefano CB. CAR T-Cell Therapy for Patients with Multiple Myeloma: Current Evidence and Challenges. *Blood Lymphat Cancer*. 2022;12:119-136.

6. Mougiakakos D, Krönke G, Völkl S, et al. CD19-Targeted CAR T Cells in Refractory Systemic Lupus Erythematosus. *The New England journal of medicine*. 2021;385(6):567-569.
7. Reinhard K, Rengstl B, Oehm P, et al. An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors. *Science*. 2020;367(6476):446-453.
8. Papathanasiou MM, Stamatis C, Lakelin M, Farid S, Titchener-Hooker N, Shah N. Autologous CAR T-cell therapies supply chain: challenges and opportunities? *Cancer Gene Therapy*. 2020;27(10):799-809.
9. Yip A, Webster RM. The market for chimeric antigen receptor T cell therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(3):161-162.
10. INCA MdS. Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil 2020.
11. Tang J, Hubbard-Lucey VM, Pearce L, O'Donnell-Tormey J, Shalabi A. The global landscape of cancer cell therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018;17(7):465-466.
12. Ghassemi S, Nunez-Cruz S, O'Connor RS, et al. Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(9):1100-1109.
13. Seow Y, Wood MJ. Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors. *Molecular Therapy*. 2009;17(5):767-777.
14. Wagner DL, Fritsche E, Pulsipher MA, et al. Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2021:1-15.
15. Mi J-Q, Zhao W, Jing H, et al. Phase II, Open-Label Study of Ciltacabtagene Autoleucel, an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor–T-Cell Therapy, in Chinese Patients With Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (CARTIFAN-1). *Journal of Clinical Oncology*. 0(0):JCO.22.00690.
16. Patel U, Abernathy J, Savani BN, Oluwole O, Sengsayadeth S, Dholaria B. CAR T cell therapy in solid tumors: A review of current clinical trials. *EJHaem*. 2022;3:24-31.
17. Chicaybam L, Abdo L, Viegas M, et al. Transposon-mediated generation of CAR-T cells shows efficient anti B-cell leukemia response after ex vivo expansion. *Gene Ther*. 2020;27(1-2):85-95.
18. de Macedo Abdo L, Barros LRC, Saldanha Viegas M, et al. Development of CAR-T cell therapy for B-ALL using a point-of-care approach. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1752592.
19. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16011.
20. Jafarzadeh L, Masoumi E, Fallah-Mehrjardi K, Mirzaei HR, Hadjati J. Prolonged Persistence of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell in Adoptive Cancer Immunotherapy: Challenges and Ways Forward. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
21. Schubert ML, Schmitt M, Wang L, et al. Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. *Annals of Oncology*. 2021;32(1):34-48.

22. Riedl SAB, Kaiser P, Raup A, Synatschke CV, Jérôme V, Freitag R. Non-Viral Transfection of Human T Lymphocytes. *Processes*. 2018;6(10):188.
23. El-Mayta R, Zhang Z, Hamilton AG, Mitchell MJ. Delivery technologies to engineer natural killer cells for cancer immunotherapy. *Cancer Gene Therapy*. 2021;28(9):947-959.
24. Han X, Mitchell MJ, Nie G. Nanomaterials for therapeutic RNA delivery. *Matter*. 2020;3(6):1948-1975.
25. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(8):541-555.
26. Shepherd SJ, Warzecha CC, Yadavali S, et al. Scalable mRNA and siRNA Lipid Nanoparticle Production Using a Parallelized Microfluidic Device. *Nano Letters*. 2021;21(13):5671-5680.
27. Garber K. Alnylam launches era of RNAi drugs. *Nature Biotechnology*. 2018;36(9):777-778.
28. Irvine DJ, Dane EL. Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(5):321-334.
29. Vogel AB, Kanevsky I, Che Y, et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature*. 2021;592(7853):283-289.
30. Basarkar A, Singh J. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(3):353-360.
31. Scalzo S, Santos AK, Ferreira HA, et al. Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of Plasmid DNA in Cardiomyocytes. *International Journal of Nanomedicine*. 2022;17:2865-2881.
32. Guimaraes PPG, Zhang R, Spektor R, et al. Ionizable lipid nanoparticles encapsulating barcoded mRNA for accelerated in vivo delivery screening. *Journal of Controlled Release*. 2019;316:404-417.
33. Billingsley MM, Hamilton AG, Mai D, et al. Orthogonal Design of Experiments for Optimization of Lipid Nanoparticles for mRNA Engineering of CAR T Cells. *Nano Letters*. 2022;22(1):533-542.
34. Billingsley MM, Singh N, Ravikumar P, Zhang R, June CH, Mitchell MJ. Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering. *Nano letters*. 2020;20(3):1578-1589.
35. Chen D, Love KT, Chen Y, et al. Rapid Discovery of Potent siRNA-Containing Lipid Nanoparticles Enabled by Controlled Microfluidic Formulation. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(16):6948-6951.
36. Au - El-Mayta R, Au - Padilla MS, Au - Billingsley MM, Au - Han X, Au - Mitchell MJ. Testing the In Vitro and In Vivo Efficiency of mRNA-Lipid Nanoparticles Formulated by Microfluidic Mixing. *JoVE*. 2023(191):e64810.
37. Bloemberg D, Nguyen T, MacLean S, et al. A high-throughput method for characterizing novel chimeric antigen receptors in jurkat cells. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*. 2020;16:238-254.

38. McComb S, Nguyen T, Shepherd A, et al. Programmable Attenuation of Antigenic Sensitivity for a Nanobody-Based EGFR Chimeric Antigen Receptor Through Hinge Domain Truncation. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.
39. ANVISA. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-produto-de-terapia-avancada-para-tratamento-de-cancer>. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-produto-de-terapia-avancada-para-tratamento-de-cancer>. Published 2022. Accessed July, 23.
40. Knochermann HM, Smith AS, Dwyer CJ, Wyatt MM, Mehrotra S, Paulos CM. CAR T cells in solid tumors: blueprints for building effective therapies. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1740.
41. Porter D, Frey N, Wood PA, Weng Y, Grupp SA. Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel. *Journal of hematology & oncology*. 2018;11:1-12.
42. Liu Y, Fang Y, Chen X, et al. Gasdermin E-mediated target cell pyroptosis by CAR T cells triggers cytokine release syndrome. *Science immunology*. 2020;5(43):eaax7969.
43. Zheng PP, Kros JM, Wang G. Elusive Neurotoxicity in T Cell-Boosting Anticancer Therapies. *Trends Immunol*. 2019;40(4):274-278.
44. Guerrini G, Magri D, Gioria S, Medaglini D, Calzolari L. Characterization of nanoparticles-based vaccines for COVID-19. *Nature Nanotechnology*. 2022;17(6):570-576.
45. Zhao N, Qi J, Zeng Z, et al. Transfecting the hard-to-transfect lymphoma/leukemia cells using a simple cationic polymer nanocomplex. *Journal of Controlled Release*. 2012;159(1):104-110.
46. LoPresti ST, Arral ML, Chaudhary N, Whitehead KA. The replacement of helper lipids with charged alternatives in lipid nanoparticles facilitates targeted mRNA delivery to the spleen and lungs. *J Control Release*. 2022;345:819-831.
47. Dilliard SA, Cheng Q, Siegwart DJ. On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. *P Natl Acad Sci USA*. 2021;118(52).
48. Oberli MA, Reichmuth AM, Dorkin JR, et al. Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy. *Nano Letters*. 2017;17(3):1326-1335.
49. Inoue T, Swain A, Nakanishi Y, Sugiyama D. Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. *Anticancer research*. 2014;34(8):4539-4550.
50. Jiang J, Ahuja S. Addressing Patient to Patient Variability for Autologous CAR T Therapies. *J Pharm Sci*. 2021;110(5):1871-1876.
51. Melenhorst JJ, Chen GM, Wang M, et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. *Nature*. 2022;602(7897):503-509.
52. Bove C, Arcangeli S, Falcone L, et al. CD4 CAR-T cells targeting CD19 play a key role in exacerbating cytokine release syndrome, while maintaining long-term responses. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2023;11(1):e005878.

53. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2123-2138.
54. Shah NN, Highfill SL, Shalabi H, et al. CD4/CD8 T-Cell Selection Affects Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Potency and Toxicity: Updated Results From a Phase I Anti-CD22 CAR T-Cell Trial. *J Clin Oncol*. 2020;38(17):1938-1950.

Abbreviations: CAR, Chimeric Antigen Receptor; B-ALL, B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia; BCL, B-cell Lymphoma; MM, Multiple Myeloma; PEI, Polyethylenimine; PDMAEMA, Poly(2-dimethylamino) ethyl methacrylate; LNP, Lipid Nanoparticle; pDNA, Plasmid DNA; DOPE, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, C14-PEG, 1,2-dimyristoylsn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000] (ammonium salt), PDI, Polydispersity Index; MFI, Mean Fluorescence Intensity; COEP-UFMG, Ethics Research Committee of the Federal University of Minas Gerais; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; rhIL-2, Recombinant Human Interleukin 2

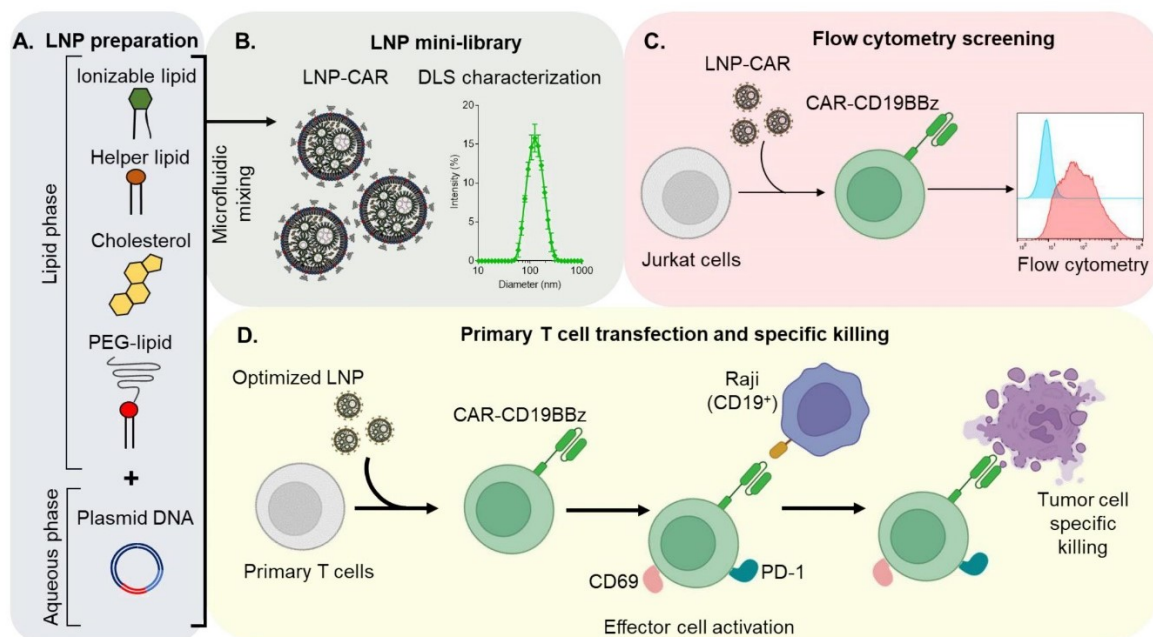


Fig. 1 – Schematic workflow for the optimization of DNA-loaded LNPs for the expression of CAR-CD19BBz. (A) Schematic representation of the components used for LNP synthesis by microfluidic. (B) Representation of the mini-library of LNPs (left) and DLS measurement of the optimized LNP-9-CAR. (C) Schematic representation of LNP screening using Jurkat cells. (D) Representation of the transfection of T cells using the optimized LNP for the expression of CAR-CD19BBz and co-culture experiments with Raji cells to assess effector cell activation and tumor cell specific killing.

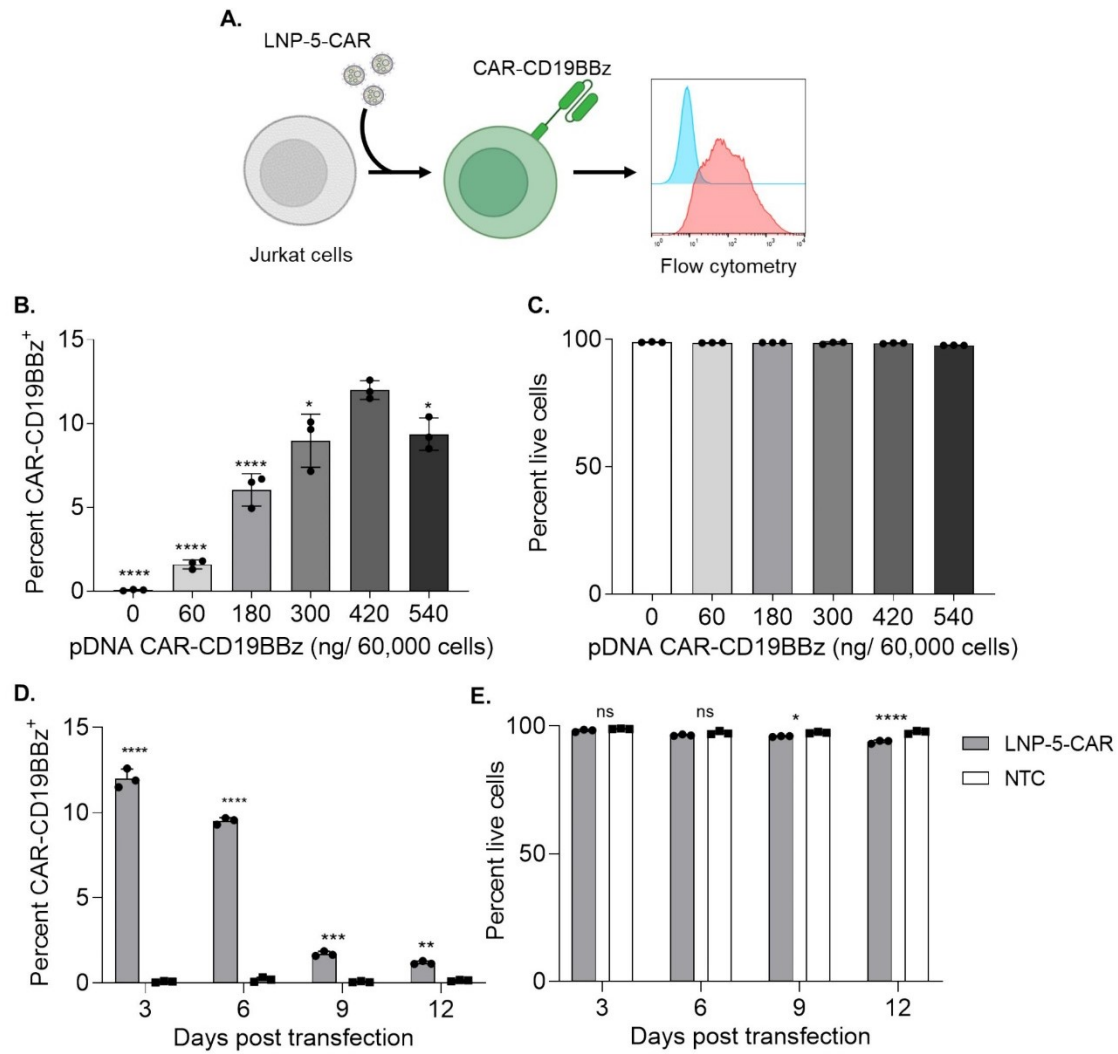


Fig. 2 – DNA loaded LNPs induce transient expression of CAR-CD19BBz in Jurkat cells. (A) Schematic of LNP-CAR mediated transfection of Jurkat cells. (B) CAR-CD19BBz expression in live (PI⁻) Jurkat cells 3 days after transfection with LNP-5-CAR with different amounts of pDNA identifying the best concentration to be used. * p<0.05; **** p<0.0001 versus 420 ng/ 60,000 cells evaluated by one-way ANOVA with n=3. (C) Cell viability of Jurkat cells assessed by the frequency of PI⁻ cells after transfection with LNP-5-CAR. ****p<0.0001 versus 0 ng evaluated by one-way ANOVA with n=3. (D) CAR-CD19BBz expression over time in Jurkat cells treated with 420 ng/60000 cells of LNP-5-CAR confirming the transient expression of CAR in these cells. ** p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 versus NTC on the same timepoint evaluated by one-way

ANOVA with $n=3$. (E) Cell viability of Jurkat cells over time. * $p<0.05$; **** $p<0.0001$;
Not significant (ns) $p>0.05$ versus NTC on the same timepoint evaluated by one-way
ANOVA with $n=3$.

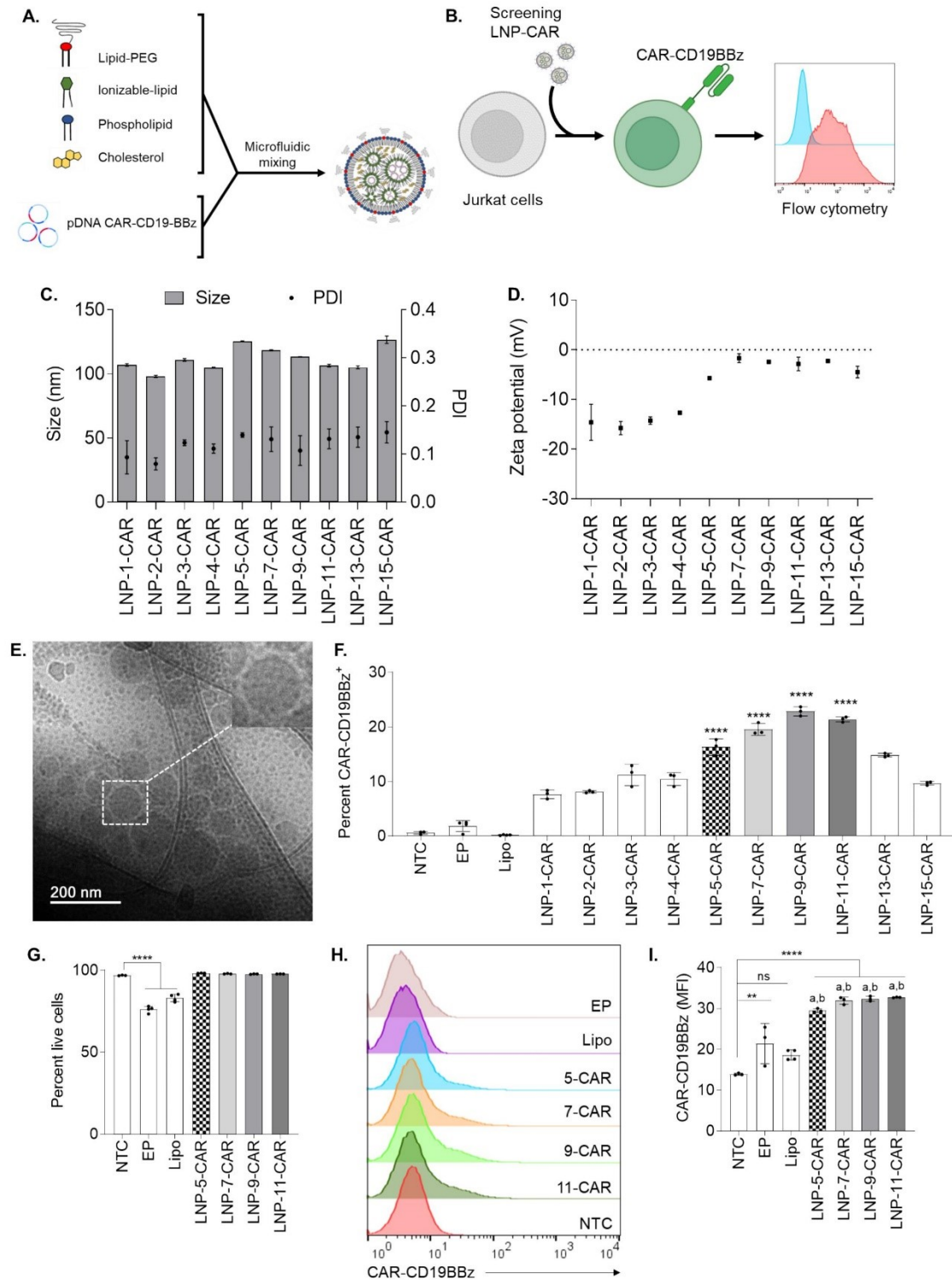


Fig. 3 – Higher DOPE molar ratios facilitate efficient transfection with CAR-CD19BBz in Jurkat cells. (A) Schematic of the components used to prepare LNPs by microfluidic mixing. (B) Schematic of LNP-CAR screening using Jurkat cells. (C) Hydrodynamic diameter (Size) and polydispersity index (PDI) of different LNPs

encapsulating CAR-CD19BBz pDNA. (D) Zeta potential of different LNPs. (E) Representative cryo-TEM of LNPs encapsulating pDNA. (F) CAR-CD19BBz expression in live (PI⁻) Jurkat cells 3 days after transfection with different LNPs identifying top-performing LNPs. **** $p < 0.0001$ versus NTC evaluated by one-way ANOVA with $n=3$. (G) Cell viability of Jurkat cells assessed by the frequency of PI⁻ cells after transfection with top-performing LNPs **** $p < 0.0001$ versus NTC; evaluated by one-way ANOVA with $n=3$. (H) Representative histograms of CAR-CD19BBz expression after transfection. NTC = non-transfected control; EP = Electroporation; Lipo = Lipofectamine. Graphs represent mean $\pm$ SD. (I) CAR-CD19BBz expression measured by mean fluorescence intensity (MFI) after transfection with top-performing LNPs and controls. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; Not significant (ns) $p > 0.05$ versus NTC evaluated by one-way ANOVA with $n=3$. 'a' = $p < 0.001$ compared to EP; 'b' = $p < 0.001$ compared to Lipo evaluated by one-way ANOVA with $n=3$. NTC = non-transfected control; EP = Electroporation; Lipo = Lipofectamine. Graphs represent mean $\pm$ SD.

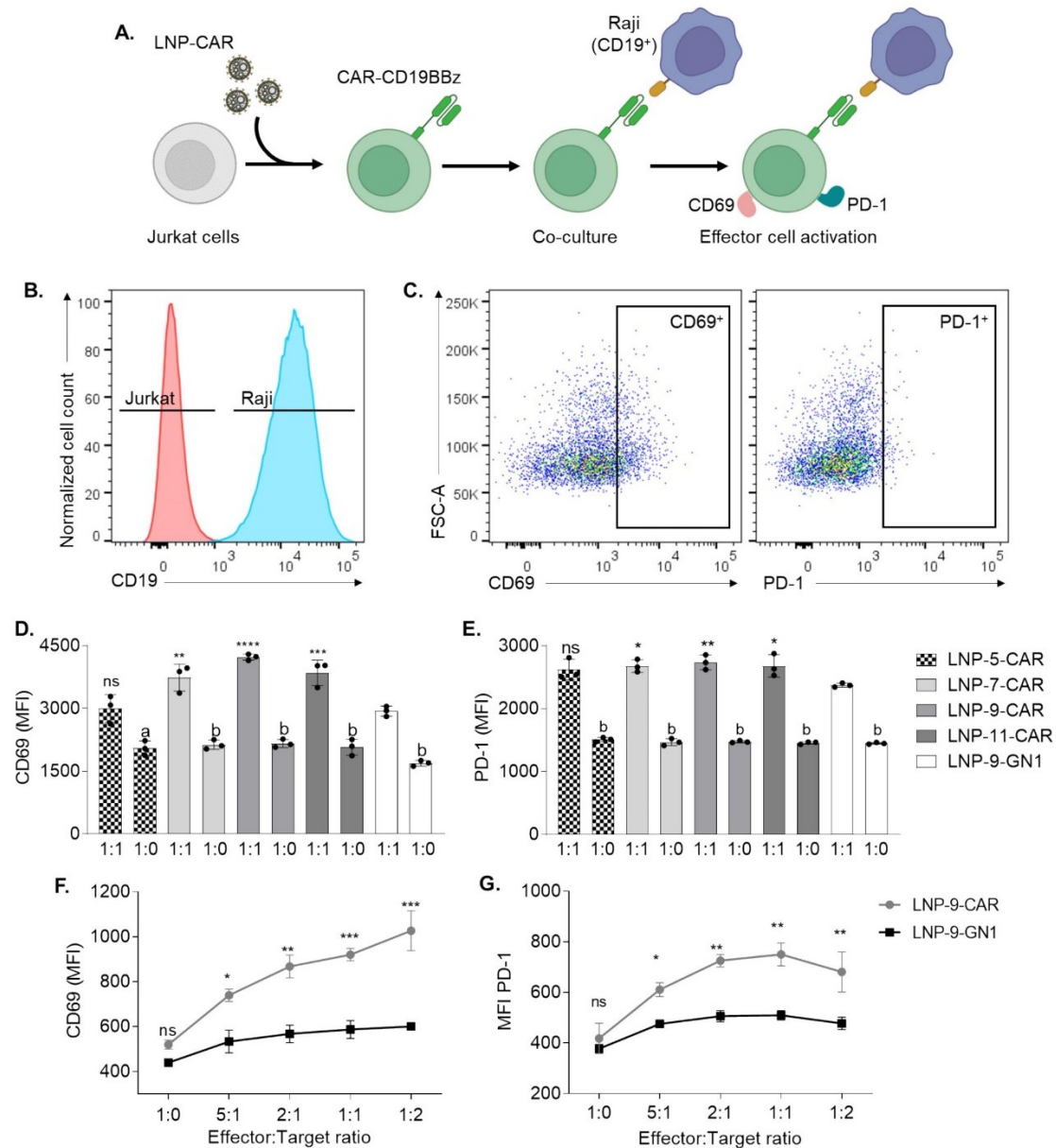


Fig. 4 – Top-performing LNPs generate CAR-Jurkat cells with high efficiency.

Jurkat cells were transfected with top-performing LNPs using 420 ng/60000 cells, collected after 3 days and co-cultured at 1:1 or 1:0 ratios with Raji cells. (A) Schematic of Jurkat cell transfection with LNP-CAR and effector cell activation after co-culture with Raji cells. (B) Representative histogram of Jurkat and Raji cells distinguished based on the expression of CD19. (C) Expression of activation markers PD-1 and CD69 in Jurkat cells expressing CAR-CD19BBz. (D-E) Activation of Jurkat cells expressing CAR-

CD19BBz measured by mean fluorescence intensity (MFI) of CD69 (D) and PD-1 (E) after 24 hours co-cultured with Raji cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Not significant (ns) $p > 0.05$ versus LNP-9-GN1; 'a' = $p < 0.001$ compared to 1:1; 'b' = $p < 0.0001$ compared to 1:1; evaluated by one-way ANOVA with $n=3$. (F-G) Activation of Jurkat cells transfected with the optimized formulation LNP-9 24 hours after co-culture with Raji cells at different effector-to-target ratios. Activation was assessed by the expression of CD69 (F) and PD-1 (G). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Not significant (ns) $p > 0.05$ evaluated by two-way ANOVA with $n=3$. Graphs represent mean $\pm$ SD.

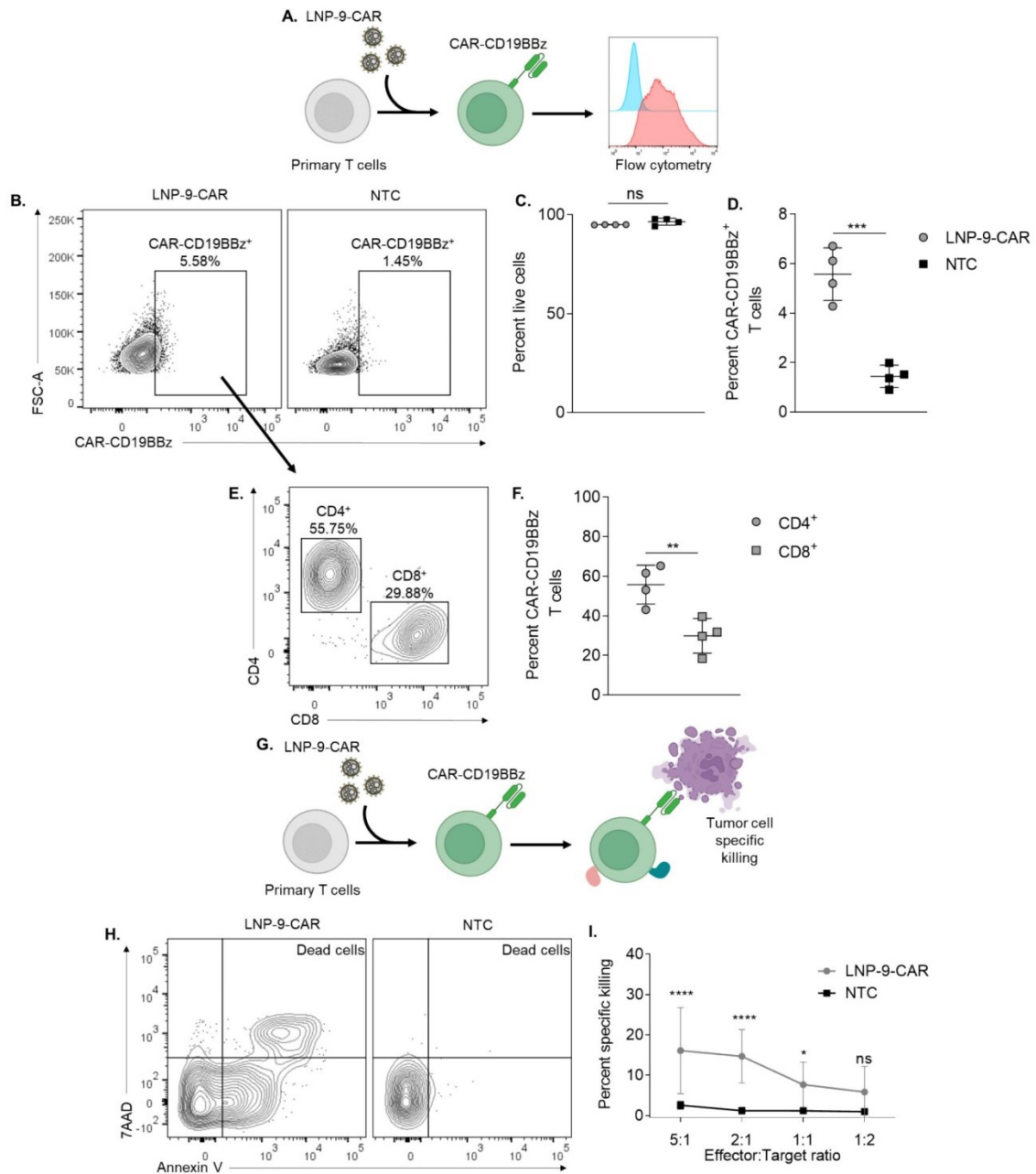


Fig. 5 – LNP-9-CAR promotes functional delivery of pDNA to primary human T cells. (A) Schematic of primary human T cell transfection with LNP-9-CAR (B) Representative plots of CAR-CD19BBz expression 3 days after transfection of primary human T cells with LNP-9-CAR. (C) Cell viability of CD3⁺ cells 3 days after transfection with LNP-9-CAR. Not significant (ns) p>0.05 evaluated by unpaired t test compared to NTC. (D) Frequency of Live/CD3⁺/CAR-CD19BBz⁺ T cells analyzed 3 days after transfection with LNP-9-CAR. ***p<0.001 evaluated by unpaired t test compared to

NTC. (E) Representative plots of T cell subsets expressing CAR-CD19BBz 3 days after transfection with LNP-9-CAR identified by the expression of CD4 and CD8. (F) Frequency of Live/CD3⁺/CAR-CD19BBz⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells analyzed 3 days after transfection with LNP-9-CAR. **p<0.01 evaluated by unpaired t test compared to NTC. (G) Schematic of T cell transfection with LNP-9-CAR and tumor cell specific killing in co-culture with Raji cells. (H) Representative plots of Annexin V/7AAD labeled cells gated on the CD3⁺/CD19⁺ population. Dead cells are labeled as double positive for both markers. (I) Results of specific killing of CD19⁺ 24 hours after coplating with CAR T cells or non-transfected cells at different ratios. * p<0.05; ****p<0.0001; Not significant (ns) p>0.05 evaluated by two-way ANOVA with n=4 donors. NTC = non-transfected control. Graphs represent mean $\pm$ SD.

Table 1: Composition and characterization of pDNA-ZsGreen encapsulated in LNPs with different DOPE and Cholesterol ratios

LNP	Molar ratio (%)				Characterization			
	C12-200	DOPE	Cholesterol	C14PEG	Diameter (nm)	PDI	Zeta (mV)	ZsGreen pDNA (ng/uL)
1-GN1	35	15	47,5	2,5	97,20 $\pm$ 0,71	0,111 $\pm$ 0,008	-12,20 $\pm$ 10,40	104,0
2-GN1	35	20	42,5	2,5	122,70 $\pm$ 13,60	0,143 $\pm$ 0,012	-10,80 $\pm$ 4,99	126,5
3-GN1	35	25	37,5	2,5	118,00 $\pm$ 1,58	0,152 $\pm$ 0,007	-6,19 $\pm$ 8,12	101,8
4-GN1	35	30,5	32	2,5	109,50 $\pm$ 2,34	0,106 $\pm$ 0,013	-3,13 $\pm$ 7,85	114,3
5-GN1	35	32,5	30	2,5	126,00 $\pm$ 0,20	0,106 $\pm$ 0,013	-2,08 $\pm$ 0,53	301,3
9-GN1	35	47,2	20	2,5	118,40 $\pm$ 3,02	0,149 $\pm$ 0,021	-10,70 $\pm$ 0,63	224,0

Notes: Data shown as mean $\pm$ SEM

Abbreviations: DOPE, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; PDI, polydispersity index; C14PEG, Polyethylene Glycol (PEG) 2000.

Table 2: Composition and characterization of pDNA-CAR-CD19BBz encapsulated LNPs with different DOPE and Cholesterol ratios

LNP	Molar ratio (%)				Characterization				
	C12-200	DOPE	Cholesterol	C14PEG	Diameter (nm)	PDI	Zeta (mV)	CAR-CD19BBz pDNA (ng/uL)	Encapsulation efficiency (%)
1-CAR	35	16	46,5	2,5	107,00 ± 0,95	0,093 ± 0,034	-14,60 ± 3,64	184,4	79,6
2-CAR	35	20	42,5	2,5	98,18 ± 0,86	0,080 ± 0,013	-15,77 ± 1,33	173,9	80,9
3-CAR	35	25	37,5	2,5	111,00 ± 1,06	0,124 ± 0,006	-14,27 ± 0,78	176,7	81,4
4-CAR	35	30,5	32	2,5	104,90 ± 0,36	0,111 ± 0,010	-12,67 ± 0,15	182,6	81,6
5-CAR	35	32,5	30	2,5	125,40 ± 0,44	0,139 ± 0,005	-5,71 ± 0,23	155,1	90,1
7-CAR	35	37,5	25	2,5	118,53 ± 0,40	0,131 ± 0,026	-1,69 ± 0,89	167,7	82,2
9-CAR	35	42,5	20	2,5	113,50 ± 0,17	0,107 ± 0,031	-2,41 ± 0,32	174,6	95,0
11-CAR	35	47,5	15	2,5	106,57 ± 1,00	0,132 ± 0,021	-2,86 ± 1,36	156,6	84,5
13-CAR	35	52,5	10	2,5	105,10 ± 1,10	0,135 ± 0,021	-2,27 ± 0,36	163,6	80,5
15-CAR	35	62,5	0	2,5	126,70 ± 2,92	0,145 ± 0,023	-4,48 ± 1,17	216,2	78,5

Notes: Data shown as mean ± SEM

Abbreviations: DOPE, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; PDI, polydispersity index; C14PEG, Polyethylene Glycol (PEG) 2000.

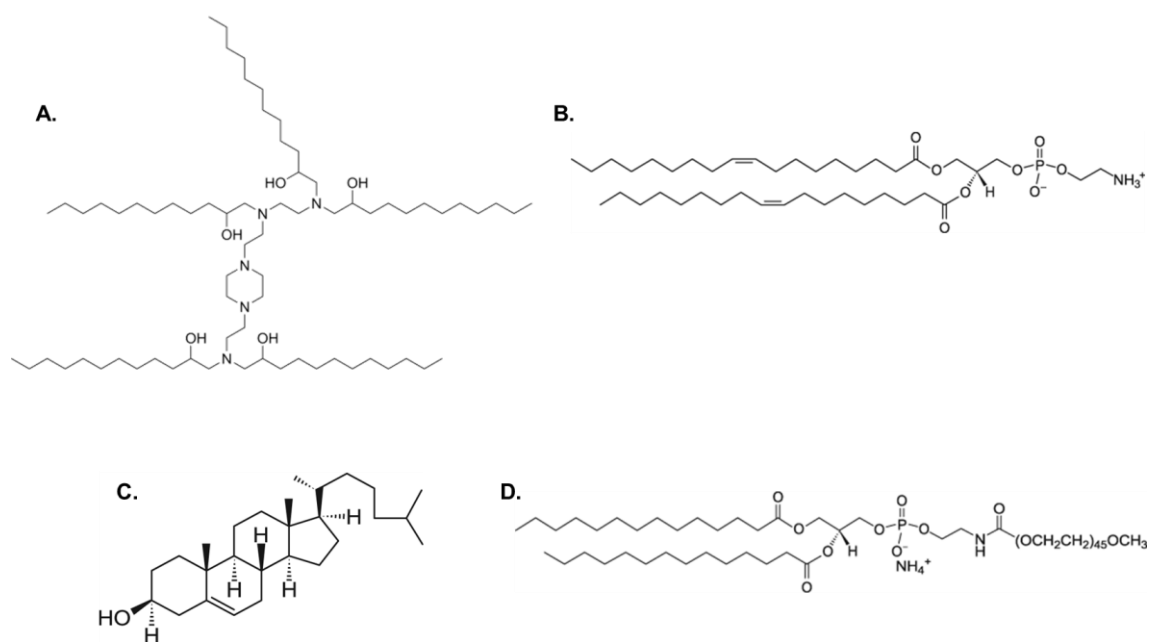


Fig. S1 – Structure of the lipid components used to generate LNPs. (A) Structure of C12-200 (B) Structure of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE). (C) Structure of cholesterol. (D) Structure of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000] (ammonium salt) (C14-PEG 2000).

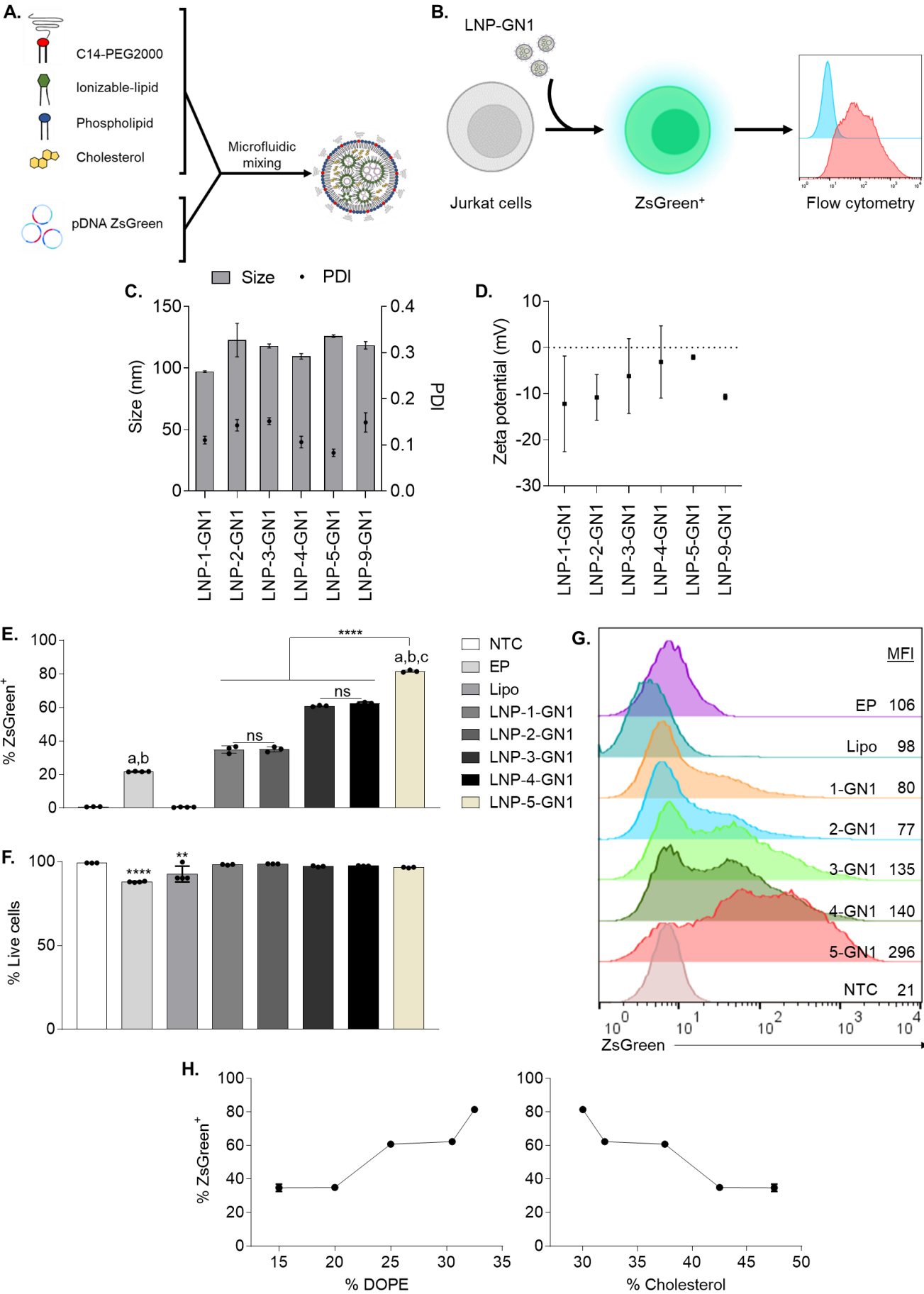


Fig. S2 – Formulations with high DOPE molar ratios promote efficient transfection of Jurkat cells in vitro. (A) Schematic of the components used to prepare LNPs by microfluidic mixing. (B) Schematic of LNP-GN1 screening using Jurkat cells. (C) Hydrodynamic diameter (Size) and polydispersity index (PDI) of different LNPs encapsulating ZsGreen pDNA. (D) Zeta potential of different LNPs. (E) Frequency of ZsGreen⁺ Jurkat cells analyzed in live cells (PI-) 3 days after transfection with different LNPs at a dose of 420 ng/60000 cells. ‘a’ = $p < 0.001$ compared to NTC; ‘b’ = $p < 0.001$ compared to EP; ‘c’ = $p < 0.001$ compared to Lipo; **** $p < 0.0001$; Not significant (ns) $p > 0.05$ evaluated by one-way ANOVA with $n=3$. (F) Cell viability after transfection with different LNPs determined by the frequency of PI⁻ cells. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ versus NTC; evaluated by one-way ANOVA with $n=3$. (G) Representative histograms of ZsGreen expression after transfection ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ versus NTC; evaluated by one-way ANOVA with $n=3$. (H) Effects of different ratios of DOPE (left) and Cholesterol (right) on the expression of ZsGreen, each point represents the frequency of live (PI-) cells expressing ZsGreen fluorescence; NTC = non-transfected control; EP = Electroporation; Lipo = Lipofectamine. Graphs represent mean $\pm$ SD.

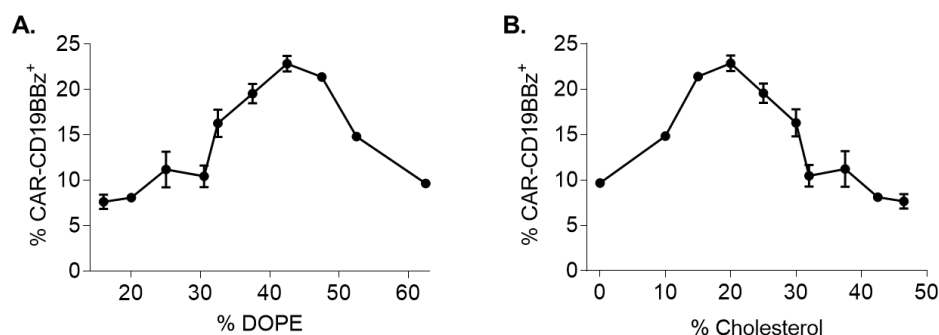


Fig. S3 – Correlation between helper lipids and transfection efficiency of LNPs in Jurkat cells. Effects of different ratios of DOPE (A) and Cholesterol (B) on the expression of CAR-CD19BBz. Each point represents the frequency of live (PI⁻) cells expressing CAR-CD19BBz evaluated 3 days after transfection. Graphs represent mean $\pm$ SD.

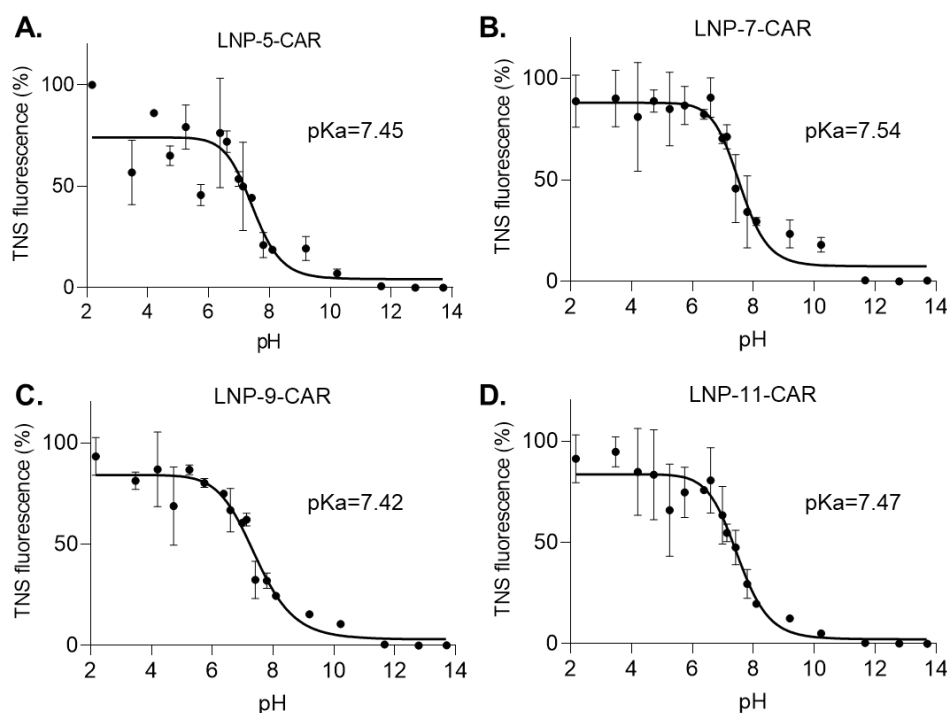


Fig. S4 – Morphological and physical-chemical characterization of top-performing LNPs. (A-D) pKa of top-performing formulations encapsulating pDNA for CAR-CD19BBz expression, (A) LNP-5-CAR, (B) LNP-7-CAR (C) LNP-9-CAR and (D) LNP-11-CAR. Graphs represent mean $\pm$ SD.

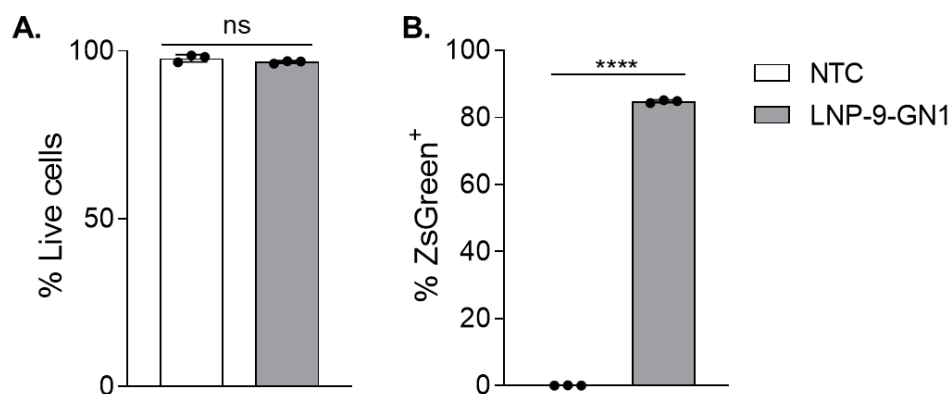


Fig. S5 – Optimized formulation for transfection of T cells induces the expression of ZsGreen on Jurkat cells *in vitro*. (A) Cell viability after transfection with LNP-9-GN1 determined by the frequency of PI⁻ cells. Not significant (ns) $p > 0.05$ evaluated by unpaired t test compared to NTC with $n=3$. (B) Frequency of ZsGreen⁺ Jurkat cells analyzed in live cells (PI⁻) 3 days after transfection with a dose of 420 ng/60000 cells. **** $p < 0.0001$ evaluated by unpaired t test compared to NTC with $n=3$. Graphs represent mean $\pm$ SD.

6.2. Capítulo 2 - Aplicação de mRNA modificado para produção de células CAR T para tumores sólidos

O objetivo geral dessa sessão foi “**Utilizar a LNP otimizada para a produção de células CAR T contra tumores sólidos utilizando mRNA sintetizado por IVT**”. Para isso, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Validar a formulação otimizada para a entrega de pDNA para linfócitos T comparando a eficiência de transfecção com formulações utilizando lipídeos comerciais;
- Sintetizar um mRNA para expressão de CAR anti-CLDN6 (CAR-CLDN6) com bases modificadas por IVT;
- Encapsular o mRNA para CAR-CLDN6 na formulação otimizada e avaliar a transfecção em células Jurkat;
- Avaliar a ativação de células Jurkat expressando CAR-CLDN6 quando co-cultivadas com células Colo-205 (CLDN6⁺);
- Transfectar linfócitos T humanos primários com mRNA para CAR-CLDN6 e avaliar sua capacidade citotóxica contra células de câncer colorretal humano (Colo-205);

6.2.1. Comparação da transfecção com LNP-9 com diferentes lipídeos ionizáveis

Como demonstramos anteriormente, a formulação LNP-9 sintetizada com C12-200 entrega pDNA de forma eficiente para linfócitos T (PRAZERES; FERREIRA; COSTA; DA SILVA *et al.*, 2023). No entanto, para que esta formulação possa ser utilizada como sistema de entrega de outros ácidos nucleicos, bem como para outras aplicações, é necessário comparar sua performance com lipídeos já aprovados para essa finalidade. Dessa forma, encapsulamos o pDNA que codifica para ZsGreen substituindo o C12-200 (LNP-9-C12) pelos lipídeos SM-102 (LNP-9-SM), ALC-0315 (LNP-9-ALC) e D-Lin-MC3-DMA (LNP-9-MC3) na mesma proporção molar, utilizando microfluídica (**Tabela 6 e Figura 10A**). O tamanho das formulações obtidas variou de 90,88 a 129,30 nm, com a LNP-C12 apresentando o maior diâmetro ($129,30 \pm 0,62$). Os valores de PDI foram considerados adequados, variando entre 0,207 e 0,162, indicando a formação de sistemas monodispersos. O potencial zeta variou entre -0,78 e 3,70, permanecendo próximo à neutralidade em todas as formulações (**Tabela 6 e Figura 10B-D**).

Tabela 6: Composição e caracterização das LNPs sintetizadas com diferentes lipídeos ionizáveis encapsulando pDNA para ZsGreen

	Razão molar (%)				Caracterização			
	Lipídeo ionizável	DOPE	Colesterol	Lipídeo PEGuilado	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)	ZsGreen pDNA (ng/uL)
LNP-9-C12	35	42,5	20	2,5	129,30 ± 0,62	0,192 ± 0,006	-0,78 ± 0,27	203,3 ± 5,8
LNP-9-SM	35	42,5	20	2,5	96,73 ± 0,90	0,207 ± 0,043	3,70 ± 1,32	94,2 ± 2,5
LNP-9-ALC	35	42,5	20	2,5	90,88 ± 0,48	0,191 ± 0,011	1,51 ± 0,50	83,4 ± 6,5
LNP-9-MC3	35	42,5	20	2,5	99,59 ± 1,52	0,162 ± 0,022	3,35 ± 1,06	145,0 ± 2,5

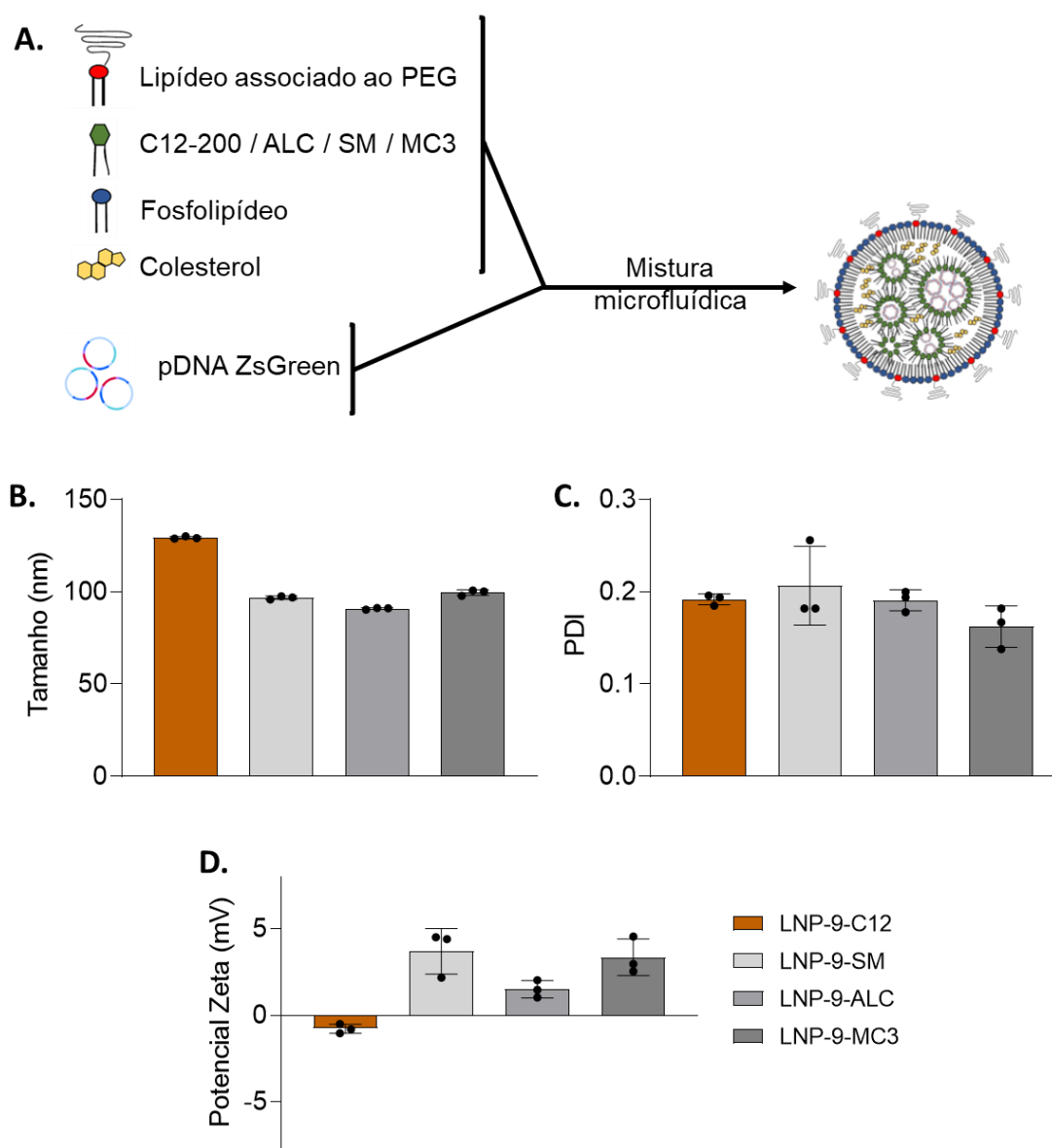


Figura 10: Síntese e caracterização de LNPs sintetizadas com diferentes lipídeos ionizáveis encapsulando pDNA para ZsGreen. **A.** Desenho esquemático dos componentes utilizados para preparar LNPs por mistura microfluídica. **B-D.** Caracterizações de tamanho (**B**), PDI (**C**) e potencial zeta (**D**) das LNPs.

Uma vez caracterizadas, as LNPs foram adicionadas a células Jurkat utilizando 420 ng/60.000 células, e a frequência de células ZsGreen⁺, bem como a viabilidade celular e a intensidade média de fluorescência (MFI) de ZsGreen foram avaliados por citometria de fluxo depois de 3 dias (**Figura 11A**). A viabilidade celular não foi afetada pelo tratamento com as LNPs (**Figura 11B**). No entanto, observamos uma frequência de células ZsGreen⁺ significativamente maior após a transfecção com a LNP-9-C12 quando comparada com as demais (**Figura 11C**). Além disso, a LNP-9-SM induziu uma transfecção maior nas células Jurkat que a LNP-9-ALC e a LNP-9-MC3 (**Figura 11B**). Ao analisarmos o MFI, observamos que não houve variação significativa na fluorescência após a transfecção com as LNPs sintetizadas com os lipídeos comerciais, porém houve um aumento significativo na fluorescência das células transfectadas com a LNP-9-C12 (**Figura 11D**).

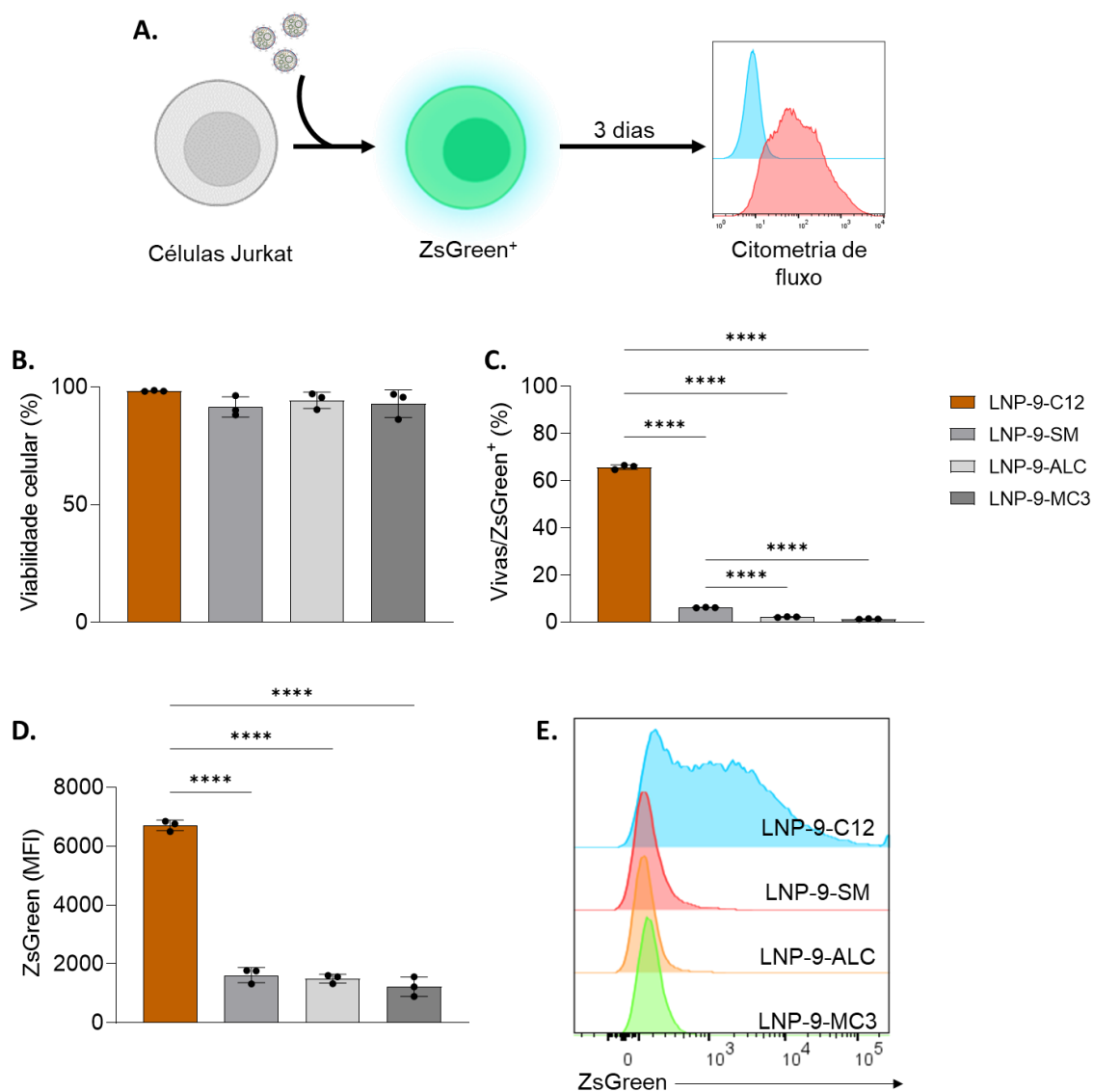


Figura 11: Transfecção com LNPs sintetizadas com diferentes lipídeos ionizáveis. A. Representação esquemática da transfecção de células Jurkat com LNPs. **B-D.** Viabilidade celular (**B**), frequência de células expressando ZsGreen (**C**) e intensidade média de fluorescência de ZsGreen (**D**) em células Jurkat 3 dias após transfecção com LNPs avaliada por citometria de fluxo. **E.** Histograma representativo da expressão de ZsGreen após transfecção com LNPs. **** $p < 0.0001$ avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

Em conjunto, esses dados demonstram que a entrega de pDNA mediada pela formulação otimizada pelo nosso grupo é superior ao que se observa em formulações utilizando lipídeos comerciais. Uma vantagem em utilizar esses lipídeos é sua aprovação nas agências regulatórias para entrega de ácidos nucleicos (AKINC; MAIER; MANOHARAN; FITZGERALD *et al.*, 2019; HUANG; KONG; ZHANG; CAO *et al.*, 2022). Sua otimização prévia também possibilita seu uso como parâmetros de comparação para novas formulações, como foi feito nesse estudo. Apesar de muito utilizado na pesquisa de base e no desenvolvimento de novas formulações para entrega de ácidos nucleicos (GUIMARAES; COSTA; SCALZO JUNIOR; FERREIRA *et al.*, 2024; GUIMARÃES; FIGUEROA-ESPADA; RILEY; GONG *et al.*, 2023), o C12-200 ainda não foi aprovado pelas agências regulatórias devido à sua toxicidade em alguns casos (DA SILVA SANCHEZ; ZHAO; HUAYAMARES; HATIT *et al.*, 2023). No entanto, essa barreira para sua utilização pode ser ultrapassada fazendo melhorias no processo produtivo do lipídeo, possibilitando a entrega segura de ácidos nucleicos (DA SILVA SANCHEZ; ZHAO; HUAYAMARES; HATIT *et al.*, 2023). Nossos dados apontam que a formulação com C12-200 é uma candidata a se tornar uma plataforma de entrega de ácidos nucleicos, abrindo possibilidades para sua aplicação direcionada a linfócitos T.

6.2.2. Síntese de mRNA CAR-CLDN6 modificado por IVT

O uso de bases modificadas na síntese de mRNA possibilitou sua ampla aplicação *in vivo* e otimizou o processo produtivo de uma molécula bastante instável (KARIKÓ; BUCKSTEIN; NI; WEISSMAN, 2005). A entrega dessa molécula utilizando LNPs, sua rápida expressão e a impossibilidade de integração ao genoma, abrem a possibilidade de sua aplicação na produção de células CAR T (BILLINGSLEY; HAMILTON; MAI; PATEL *et al.*, 2022). Nesse contexto, a formulação otimizada pelo nosso grupo para

entrega de pDNA para linfócitos pode ser uma alternativa para entrega de mRNA para essas mesmas células.

Para testar a capacidade de entrega de mRNA da LNP-9, utilizamos um pDNA para produzir mRNA para CAR-CLDN6 por IVT. Primeiramente, o pDNA foi linearizado com as enzimas de restrição NotI e SapI e o produto dessa digestão gerou um fragmento de aproximadamente 4000 pb (**Figura 12A**). Com ambas enzimas foi possível recuperar quantidades semelhantes de DNA pela extração do fragmento da agarose. Em seguida, o DNA linearizado foi adicionado ao mix de IVT contendo bases convencionais, ou substituindo o UTP por ψ UTP (**Figura 12B**). O produto da IVT purificado foi protegido com um Cap0, e analisado em gel de agarose. O mRNA produzido apresentava um tamanho de aproximadamente 1500 pb (**Figura 12C**), coerente com a construção do receptor CAR que havia sido clonado no esqueleto pmRVac (**Figura 9**, tópico de “Síntese de mRNA por IVT” na sessão de “Métodos”).

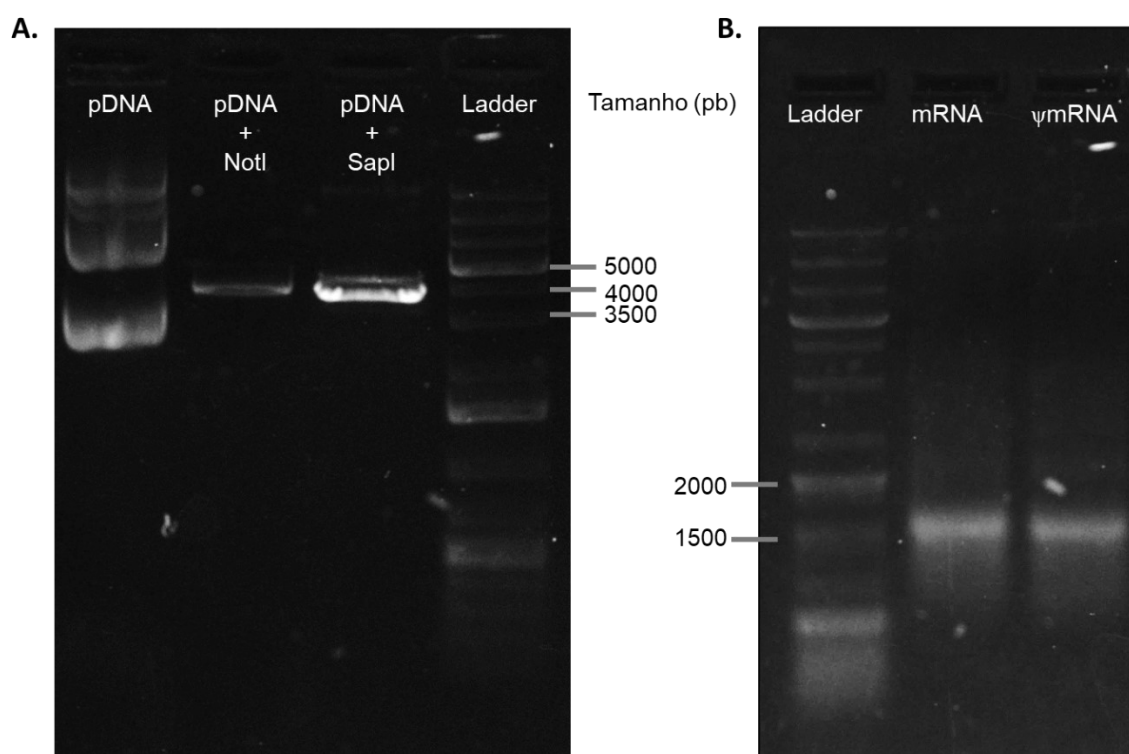


Figura 12: Géis para confirmação do tamanho dos fragmentos de ácidos nucleicos.

A. Gel de agarose 1% confirmando a digestão do plasmídeo pmRVac (pDNA) pelas enzimas NotI (pDNA + NotI) e SapI (pDNA + SapI). **B.** Gel de agarose 1,4% confirmando o tamanho do mRNA produzido com bases não modificadas (mRNA) e substituindo o UTP por ψ UTP na síntese por IVT (ψ mRNA).

6.2.3. Transfecção de células Jurkat com mRNA CAR-CLDN6 e ativação

Sintetizamos LNPs encapsulando o mRNA não modificado (LNP-9-mRNA-CAR) e o mRNA com ψ UTP (LNP-9- ψ mRNA-CAR) (Tabela 7 e Figura 13A). As LNPs produzidas apresentaram tamanho próximo a 100 nm (98,61 e 103,47 nm) com PDIs abaixo de 0,2 (0,199 e 0,167) e potenciais zeta negativos, mas próximos da neutralidade (-3,40 e -1,64) (Tabela 7 e Figura 13B-D). Essa caracterização indica a formação de nanopartículas homogêneas com ambos mRNAs, demonstrando que a formulação otimizada para pDNA também é capaz de encapsular mRNA.

Tabela 7: Composição e caracterização das LNPs encapsulando mRNA para CAR-CLDN6

	Razão molar (%)				Caracterização			
	C12-200	DOPE	Colesterol	Lípido PEGuilado	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)	CAR-CLDN6 mRNA (ng/uL)
LNP-9-mRNA-CAR	35	42,5	20	2,5	98,61 $\pm$ 2,37	0,199 $\pm$ 0,013	-3,40 $\pm$ 0,19	85,1 $\pm$ 7,7
LNP-9- ψ mRNA-CAR	35	42,5	20	2,5	103,47 $\pm$ 0,67	0,167 $\pm$ 0,024	-1,64 $\pm$ 1,14	75,8 $\pm$ 8,2

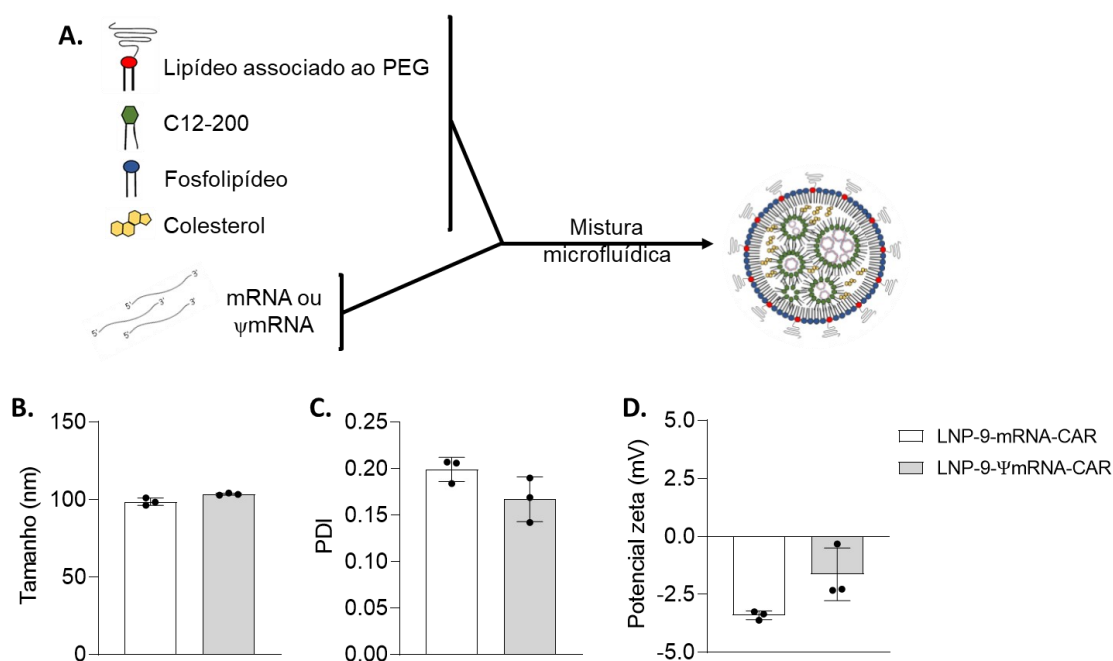


Figura 13: Síntese e caracterização de LNPs encapsulando mRNA para CAR-CLDN6. A. Desenho esquemático dos componentes utilizados para preparar LNPs por mistura microfluídica. B-D. Caracterizações de tamanho (B), PDI (C) e potencial zeta (D) das LNPs.

As formulações obtidas foram utilizadas para transfectar células Jurkat, e a transfecção foi analisada após 24 por citometria de fluxo utilizando um anticorpo para

Flag (**Tabela 1**), indicativo da expressão de CAR-CLDN6 (**Figura 14A**). A viabilidade celular não foi alterada após os tratamentos (**Figura 14B**). A expressão de CAR-CLDN6 foi maior em células transfectadas com ψ mRNA-CAR, tanto quando comparado ao controle não transfectado quanto às células transfectadas com mRNA-CAR (**Figura 14C**). O MFI relativo à expressão de CAR-CLDN6 (medido pelo brilho do anti-Flag) também foi maior em células transfectadas com o mRNA modificado (**Figura 14D e E**).

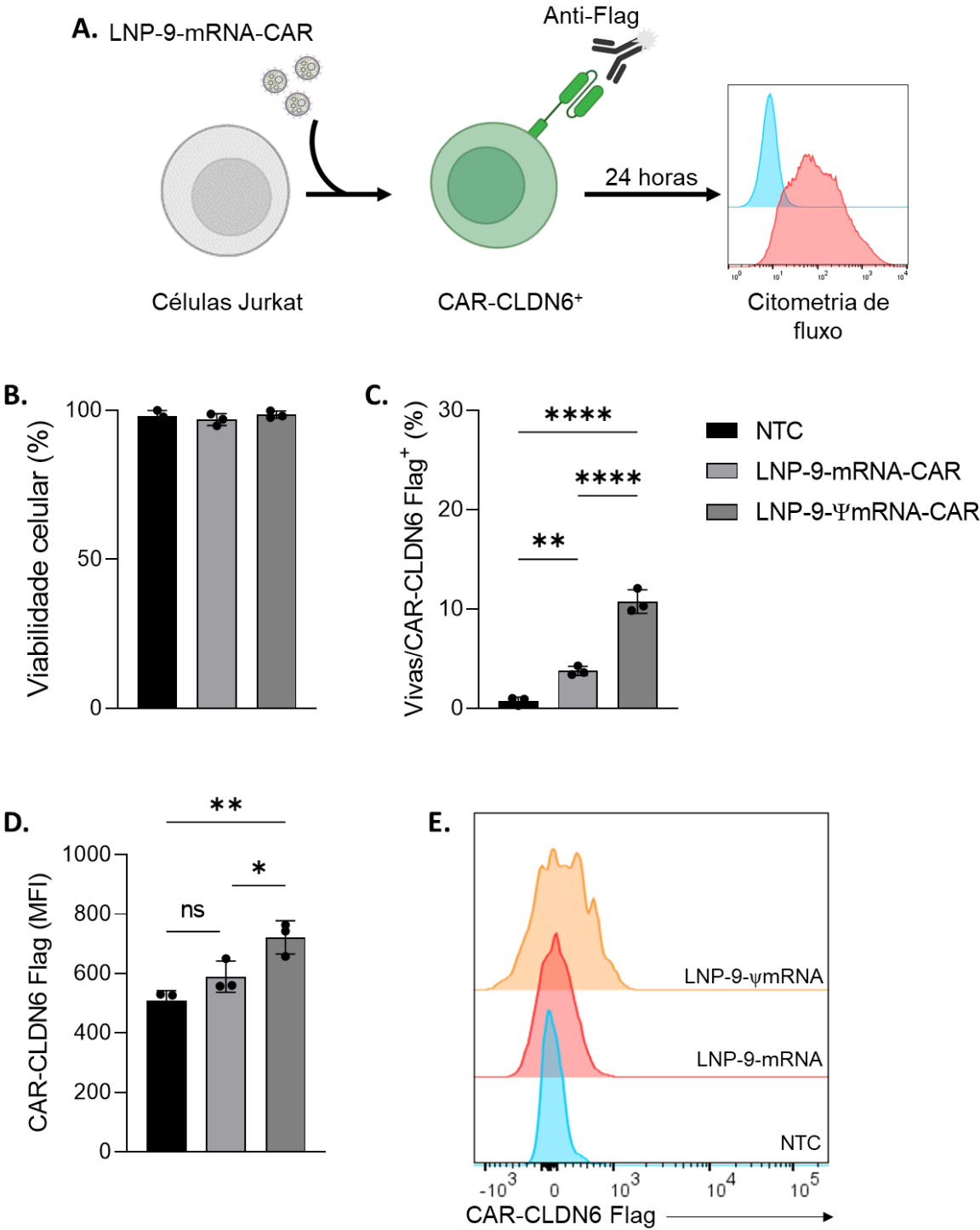


Figura 14: Transfecção de células Jurkat com LNPs encapsulando mRNA CAR-CLDN6. **A.** Representação esquemática da transfecção de células Jurkat com LNPs e detecção do receptor CAR com anticorpo anti-Flag. **B-D.** Viabilidade celular (**B**), frequência de células expressando CAR-CLDN6 Flag (**C**) e intensidade média de fluorescência de CAR-CLDN6 Flag (**D**) em células Jurkat 24 horas após transfecção com LNPs avaliada por citometria de fluxo. **E.** Histograma representativo da expressão de CAR-CLDN6 Flag após transfecção com LNPs. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; não significativo (ns) $p > 0.05$ avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

Para avaliar a funcionalidade do CAR-CLDN6 traduzido após a transfecção com mRNA, células Jurkat foram novamente transfectadas com a LNP-9-mRNA-CAR ou com a LNP-9- ψ mRNA-CAR e co-cultivadas em diferentes razões E:A com células Colo-205 (**Figura 15A**). Depois do co-cultivo, a expressão de CD69 e PD-1 em células CD4⁺ (marcador para células Jurkat) foi avaliada por citometria de fluxo. Na ausência de células alvo (razão 1:0), não houve diferença na expressão dos marcadores de ativação. Células transfectadas com ψ mRNA apresentaram níveis significativamente maiores de CD69 e PD-1 nas duas razões E:A testadas (5:1 e 1:1) quando comparadas ao controle não transfectado (**Figura 15B e C**). Por outro lado, em comparação com o controle não transfectado, células transfectadas mRNA não modificado apresentaram um aumento significativo de CD69 apenas na razão de 1:1 (**Figura 15B**) sem aumento significativo de PD-1 em nenhuma das razões avaliadas (**Figura 15C**).

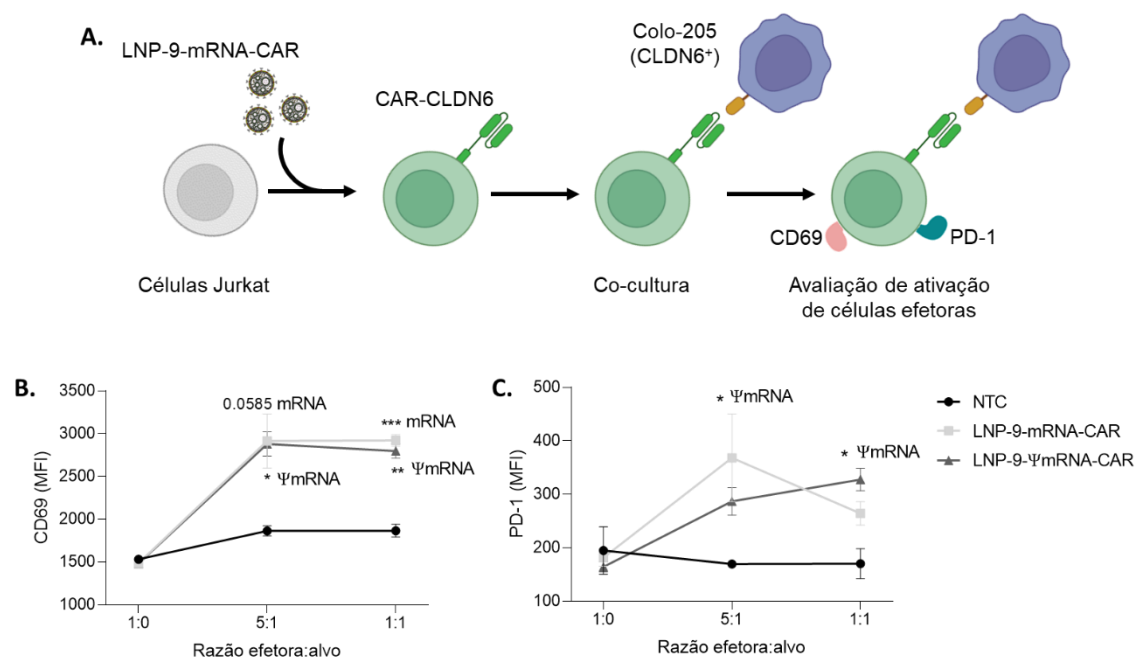


Figura 15: Ativação de células Jurkat transfetadas com mRNA CAR-CLDN6. A.

Representação esquemática da transfecção de células Jurkat com LNP e co-cultura com células alvo (Colo-205, CLDN6⁺). **B e C.** Ativação de células Jurkat 24 horas após co-cultura em diferentes razões E:A com células Colo-205. A ativação foi avaliada pela intensidade média de fluorescência dos marcadores CD69 (**B**) e PD-1 (**C**). Diferenças em relação ao controle não transfectado (NTC) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; não significativo (ns) $p > 0,05$ avaliado por ANOVA two-way. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

Em conjunto, esses dados demonstram que a modificação no mRNA com ψ UTP melhorou a transfecção de células Jurkat para a expressão de CAR-CLDN6, comparando com o mRNA não modificado. De forma importante, demonstramos que a formulação otimizada para entrega de pDNA também entrega mRNA de forma efetiva para linfócitos, apontando mais uma possível aplicação dessa plataforma.

Após o teste funcional com células Jurkat, transfectamos linfócitos T humanos primários purificados de PBMC de doadores saudáveis. Esses linfócitos foram previamente ativados com Dynabeads CD3/CD28 (Thermo Fisher) e avaliamos a transfecção com a LNP-9-mRNA-CAR ou com a LNP-9- ψ mRNA-CAR por citometria de fluxo (**Figura 16A**). A viabilidade dos linfócitos não foi afetada pela transfecção (**Figura 16B**) e não houve diferença na frequência de células transfectadas com mRNA-CAR ou ψ mRNA-CAR (**Figura 16C e D**). Além disso, não houve diferença na

transfecção das subpopulações de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) (**Figura 16E**). Analisando o MFI relativo ao CAR-CLDN6, observamos que a transfecção com LNP-9- ψ mRNA-CAR induziu um aumento significativo da expressão do receptor quando comparado ao controle não transfectado (**Figura 16F**).

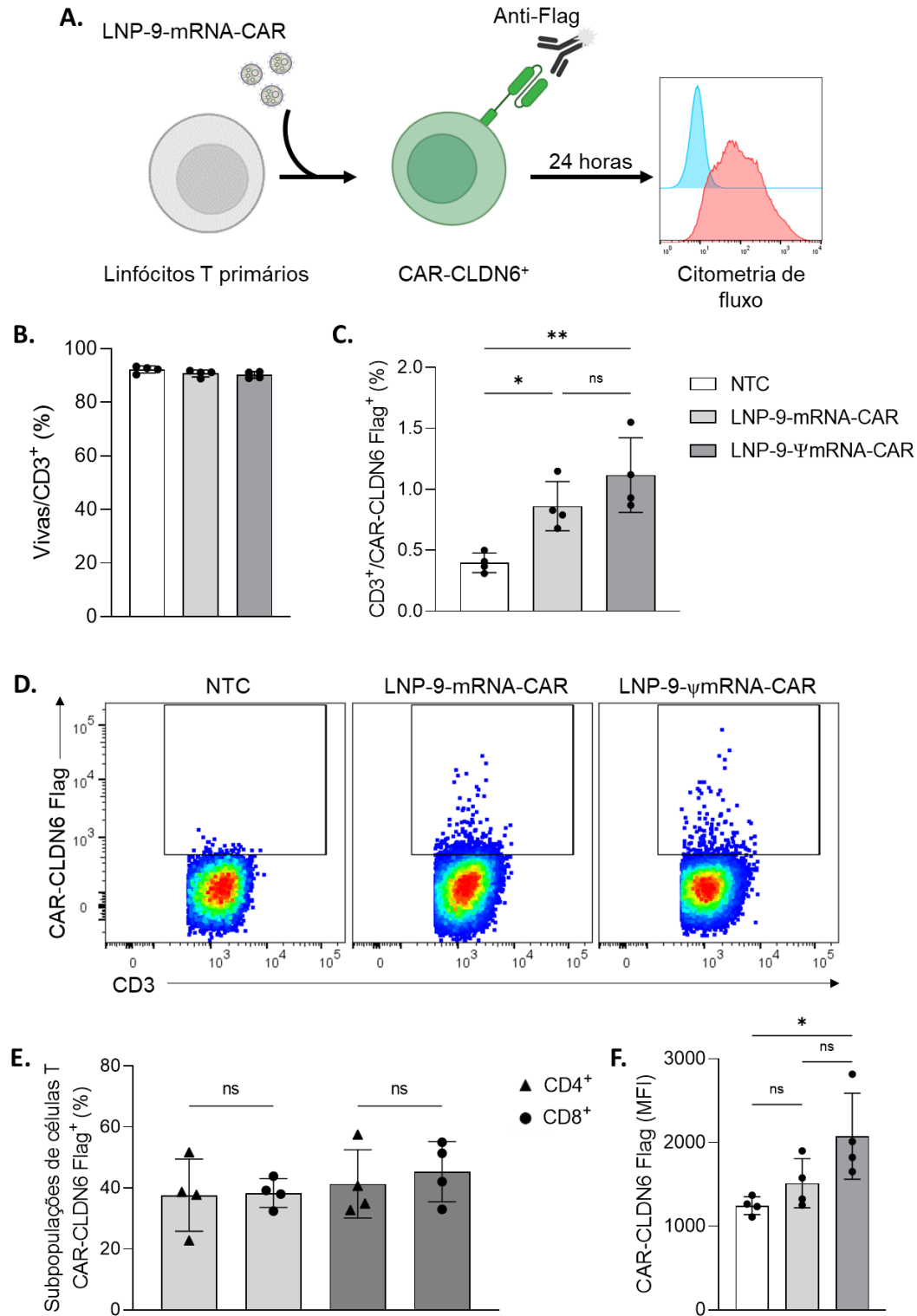


Figura 16: Transfecção de linfócitos T humanos primários com LNPs encapsulando mRNA CAR-CLDN6. **A.** Representação esquemática da transfecção de linfócitos T com LNPs e detecção do receptor CAR com anticorpo anti-Flag. **B e C.** Viabilidade celular (**B**), frequência de linfócitos T (CD3⁺) expressando CAR-CLDN6 Flag (**C**). **D.** Dotplot representativo da expressão de CAR-CLDN6 Flag após transfecção com LNPs. **E.** Frequência das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) expressando CAR-CLDN6 Flag. **F.** Intensidade média de fluorescência de CAR-CLDN6 Flag em linfócitos T 24 horas após transfecção com LNPs avaliada por citometria de fluxo. * p<0,05; ** p<0.01; não significativo (ns) p>0.05 avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média ± desvio padrão.

Para avaliar a efetividade dos linfócitos transfectados com mRNA-CAR, co-cultivamos as células transformadas com células Colo-205 marcadas com Calceína-AM (**Figura 17A**). Os linfócitos foram plaqueados nas razões de 10:1, 5:1 e 1:1 e a viabilidade foi determinada pela fluorescência da Calceína-AM. Na maior razão E:A, tanto as células transfectadas com mRNA-CAR quanto com ψ mRNA-CAR foram capazes de matar significativamente as células alvo. Na razão de 5:1 apenas as células transfectadas com ψ mRNA-CAR foram citotóxicas, enquanto na razão de 1:1 não foi observada morte específica das células alvo (**Figura 17B**).

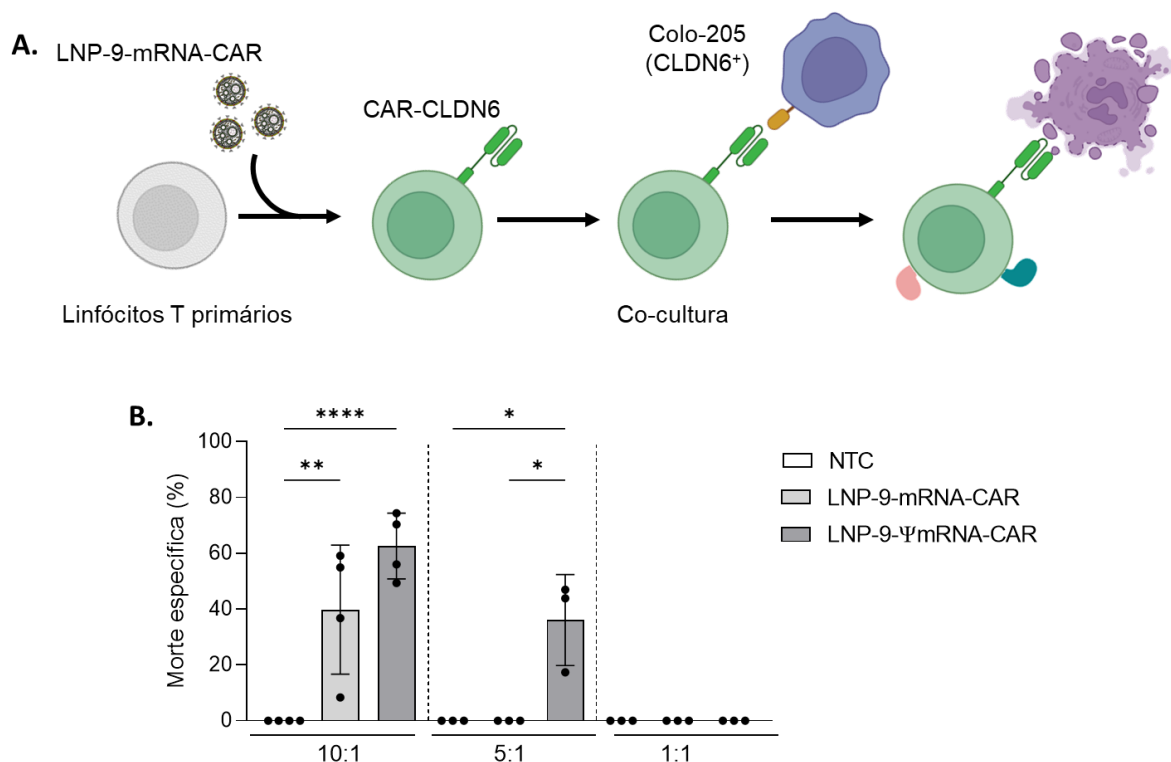


Figura 17: Efeito citotóxico de linfócitos CAR T anti-CLDN6 *in vitro* contra células Colo-205. **A.** Representação esquemática da transfecção de linfócitos T com LNP e co-cultura com células Colo-205 para avaliação de morte específica das células alvo. **B.** Morte celular de células Colo-205 co-cultivadas com linfócitos CAR T em diferentes razões E:A. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

O experimento funcional com linfócitos CAR T demonstrou a efetividade de células transformadas com mRNA que codifica para CAR-CLDN6. A diferença observada na citotoxicidade induzida por células transformadas com mRNA modificado com ψ UTP pode ser, em parte, explicada pela maior transfecção utilizando a LNP-9- ψ mRNA-CAR. Apesar da baixa transfecção em linfócitos, foi possível observar uma citotoxicidade das células CAR T contra uma linhagem de carcinoma colorretal que expressa CLDN6. Em conjunto, os dados apresentados nessa sessão apontam que a plataforma desenvolvida pelo nosso grupo pode ser utilizada para produção de células CAR T utilizando mRNA. Algumas melhorias na formulação ainda podem ser feitas a fim de aumentar a eficiência de transfecção e sua futura aplicação no contexto da imunoterapia antitumoral.

Assim como descrito no trabalho em que utilizamos a entrega de pDNA para a produção de células CAR T, a transfecção de linfócitos pode ser melhorada fazendo modificações na composição da LNP (PRAZERES; FERREIRA; COSTA; DA SILVA *et al.*, 2023). Uma metodologia para identificar novas formulações capazes de entregar mRNA linfócitos é o *design of experiments* (DOE), no qual é planejada uma sequência de variações dos lipídeos para projetar formulações com melhor potencial de entrega (BILLINGSLEY; HAMILTON; MAI; PATEL *et al.*, 2022). A síntese de novos lipídeos ionizáveis é uma alternativa para melhorar a entrega de ácidos nucleicos, influenciando principalmente sua captação e direcionamento *in vivo*, mas possibilita também a otimização de processos *ex vivo* e de edição gênica (HAN; XU; XU; ALAMEH *et al.*, 2024; QIU; TANG; CHEN; MURIPH *et al.*, 2022; XUE; THATTE; MAI; HALEY *et al.*, 2024).

A capacidade de entrega e direcionamento das formulações pode ser otimizada variando os lipídeos auxiliares (lipídeos PEGuilados, colesterol e fosfolipídeos) usados na síntese das LNPs. Diferentes lipídeos associados ao PEG foram utilizados para direcionar a entrega de nanopartículas *in vivo* para entrega de siRNA e mRNA (HUAYAMARES; LOKUGAMAGE; RAB; DA SILVA SANCHEZ *et al.*, 2023; KROHN-GRIMBERGHE; MITCHELL; SCHLOSS; KHAN *et al.*, 2020). LNPs sintetizadas com diferentes tipos de colesterol também foram avaliadas para entrega de mRNA. Alterar o colesterol da formulação não prejudicou a estabilidade da LNP, ao passo que melhorou a entrega de mRNA *in vitro* e *ex vivo* para linfócitos (PATEL; BILLINGSLEY; FRAZEE; HAN *et al.*, 2022). A entrega de mRNA por LNPs sintetizadas com fosfolipídeos carregados ou não também é uma alternativa para o direcionamento *in vivo* dessas nanopartículas. *In vivo*, os efeitos da substituição dos fosfolipídeos diminui a captação hepática, permitindo uma entrega melhor para o pulmão (LOPRESTI; ARRAL; CHAUDHARY; WHITEHEAD, 2022). A escolha dos lipídeos auxiliares deve ser feita com cautela, tendo em mente qual o tecido ou célula alvo deve ter uma melhor captação, bem como se a plataforma será utilizada *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*.

A otimização das LNPs é uma alternativa para melhorar a entrega de ácidos nucleicos *ex vivo* e *in vivo*, abrindo possibilidades para a produção de células CAR T e de outras imunoterapias (BILLINGSLEY; HAMILTON; MAI; PATEL *et al.*, 2022; THATTE; HAMILTON; NACHOD; MUKALEL *et al.*, 2023; ZHOU; SUN; JIA;

WANG *et al.*, 2022). A utilização de mRNAs para expressão transiente de CAR também é uma alternativa para sobrepor eventos adversos associados à integração do construto do CAR ao genoma dos linfócitos. Além disso, plataformas de entrega funcionalizadas podem ser otimizadas para transformação *in vivo* de linfócitos, eliminando a necessidade de manipulação dos linfócitos *ex vivo* sem riscos de integração ao genoma (BILLINGSLEY; GONG; MUKALEL; THATTE *et al.*). Apesar de complexa, a funcionalização da superfície de LNPs com anticorpos já foi explorada para entregar mRNA especificamente para linfócitos (TOMBÁ CZ; LACZKÓ; SHAHNAWAZ; MURAMATSU *et al.*, 2021). Assim, essa metodologia pode ser utilizada tanto na terapia CAR T quanto na imunoterapia (entregando mRNA para células imunes), mas também como ferramenta de edição gênica em células específicas com menor captação hepática da LNP.

6.3. Capítulo 3 - Desenvolvimento piloto de vacina terapêutica utilizando LNP funcionalizada encapsulando mRNA-OVA

O objetivo geral dessa sessão foi **“Funcionalizar a LNP otimizada para entrega específica de mRNA para células CD11b+ e testar sua eficácia como vacina terapêutica em modelo animal”**. Para isso, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar formulação otimizada (LNP-9) encapsulando mRNA que codifica para OVA (mRNA-OVA) utilizando lipídeo PEGuilado modificado com Maleimida;
- Tioar um anticorpo com reagente de Traut para funcionalizar LNPs e caracterizar as LNPs funcionalizadas;
- Avaliar a captação *in vitro* da LNP funcionalizada por células dendríticas imortalizadas (JawsII);
- Imunizar animais C57Bl/6 com as LNPs e inocular células B16F10-OVA para induzir o crescimento tumoral;
- Avaliar o imunofenótipo de células linfoides e mieloides de animais imunizados e com tumor após ativação *ex vivo*;

6.3.1. A funcionalização induz mudanças físico-químicas nas LNPs

Uma estratégia para direcionar LNPs de forma mais assertiva para tipos celulares específicos é ligar covalentemente moléculas ou anticorpos à superfície dessas LNPs (MA; FENTON, 2023; SAKURAI; ABE; YOSHIKAWA; OYAMA *et al.*, 2022). Para isso, utilizamos um lipídeo PEGuilado modificado, que possui um grupo Maleimida em sua cauda (C18-PEG 2000-Mal, referido futuramente como PEG-Mal). A reação do PEG-Mal com grupos tiol (-SH) ocorre espontaneamente à temperatura ambiente e em meio aquoso, sendo uma ferramenta importante na conjugação de proteínas à diferentes superfícies (CENGIZ; EJDERYAN; SANYAL, 2022). Utilizamos o CD11b para direcionar a captação das LNPs para células da linhagem mielóide. O CD11b é um marcador de células dessa linhagem, e sua expressão é descrita em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e monócitos. Sendo assim, esse marcador é um bom alvo para entrega direcionada a células apresentadoras de antígenos (COILLARD; SEGURA, 2021; MERAD; SATHE; HELFT; MILLER *et al.*, 2013). Para induzir o direcionamento da LNP-9 *in vivo*, sintetizamos a formulação encapsulando mRNA que codifica para OVA

modificado com ψ UTP (mRNA-OVA) e substituímos o C14-PEG 2000 utilizado nos experimentos anteriores por PEG-Mal (LNP-9-OVA; **Figura 18A e Tabela 8**). Em seguida, a LNP-9-OVA foi funcionalizada com o anticorpo anti-CD11b tiolado (CD11b-LNP-9-OVA; **Figura 8A e B**).

Foi possível observar na citometria de fluxo utilizando beads de compensação, que havia anticorpos ligados à superfície da nanopartícula (**Figura 18B**). A caracterização por DLS demonstrou que, após a funcionalização, houve um aumento significativo do tamanho das nanopartículas (de 176 para 198 nm; **Tabela 8 e Figura 18C**). O PDI também aumentou significativamente, se mantendo próximo de 0,2 (**Figura 18D**), e o potencial zeta tornou-se negativo, de 3,94 para -20,40 (**Figura 18E**). Essas mudanças estão de acordo com o que é observado na literatura e indicam que a funcionalização de fato altera a morfologia das LNPs, mesmo que isso não implique em uma alteração de sua atividade (BILLINGSLEY; GONG; MUKALEL; THATTE *et al.*). Contudo, é necessário avaliar se há algum prejuízo à morfologia das LNPs e se sua estabilidade quando armazenada pode ter sido alterada. Para os estudos deste trabalho, as formulações foram utilizadas no máximo em uma semana após a funcionalização, e mantiveram suas características por até 2 semanas.

Tabela 8: Composição e caracterização das LNPs encapsulando mRNA-OVA

	Razão molar (%)				Caracterização			
	C12-200	DOPE	Colesterol	PEG-Mal	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)	mRNA-OVA (ng/uL)
LNP-OVA	35	42,5	20	2,5	176,70 $\pm$ 4,86	0,153 $\pm$ 0,020	3,94 $\pm$ 0,37	260,4 $\pm$ 1,4
CD11b-LNP-OVA	35	42,5	20	2,5	198,50 $\pm$ 3,26	0,237 $\pm$ 0,032	-20,40 $\pm$ 1,02	340,3 $\pm$ 0,4

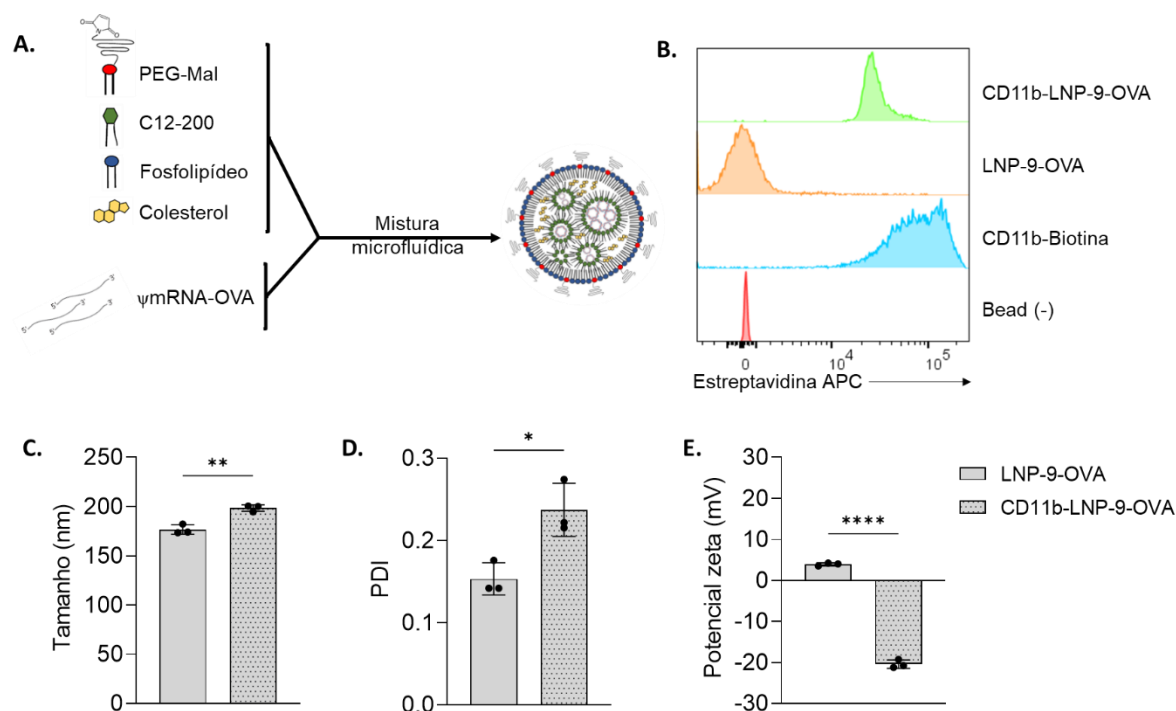


Figura 18: Síntese e caracterização de LNPs encapsulando mRNA-OVA para funcionalização. **A.** Desenho esquemático dos componentes utilizados para preparar LNPs por mistura microfluídica. **B.** Histogramas representando a ligação da CD11b-LNP-9-OVA às beads de compensação para citometria de fluxo. **C-E.** Caracterizações de tamanho (**C**), PDI (**D**) e potencial zeta (**E**) da LNP antes e depois da funcionalização com anticorpo anti-CD11b. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ avaliado por teste t não pareado. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

6.3.2. A captação da LNP funcionalizada é mais efetiva em momentos iniciais

Para avaliar a cinética de captação das LNPs utilizamos células JawsII que expressam uma variedade de marcadores mieloides, incluindo CD11b, e são caracterizadas como células dendríticas imortalizadas (JIANG; SHEN; REY-LADINO; YU *et al.*, 2008). A CD11b-LNP-9-OVA foi mais captada pelas células JawsII que a LNP-9-OVA nos tempos iniciais (30 minutos e 1 hora; **Figura 19A e B**). Depois de 4 horas não houve diferença significativa na captação das LNPs (**Figura 19B**).

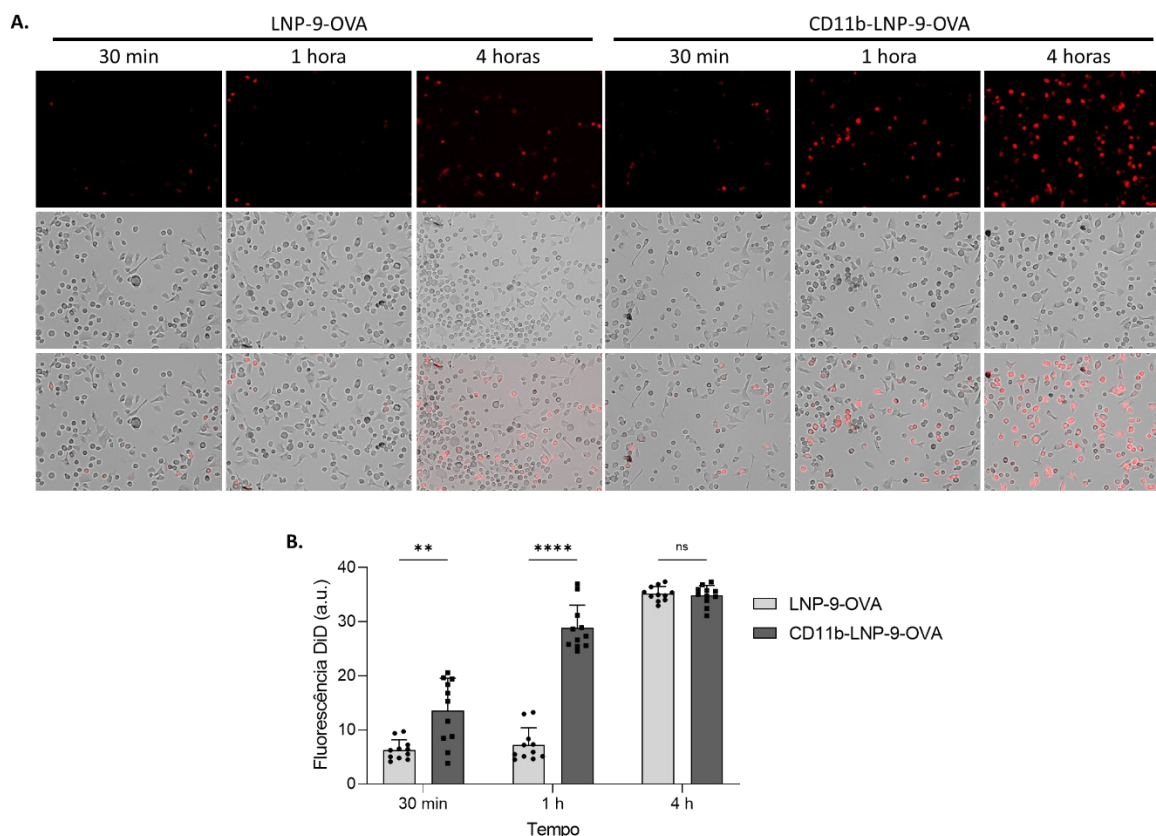


Figura 19: Captação *in vitro* de LNPs. **A.** Imagens de fluorescência de células JawsII representando a captação da LNP-9-OVA não funcionalizada (esquerda) e LNP-9-OVA funcionalizada (direita) marcadas com DiD. **B.** Quantificação da intensidade de fluorescência durante a captação das LNPs após 30 minutos, 1 hora e 4 horas. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; não significativo (ns) $p > 0.05$ avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

6.3.3. A imunização com LNP funcionalizada induz ativação de linfócitos T e produção de citocinas

Para testar o efeito protetivo da vacina utilizando a LNP direcionada para células CD11b⁺, animais C57 foram imunizados com duas doses de 5 μ g de mRNA antes da inoculação das células B16F10-OVA (**Figura 20A**). Os animais foram acompanhados por 20 dias, e na última semana de acompanhamento, 2 animais do grupo controle (PBS) morreram devido a progressão do tumor (**Figura 20B**). Ao final do experimento os animais foram eutanasiados e os tumores foram pesados. O tumor de um dos animais do grupo PBS não pôde ser retirado devido a ulcerações extensas. Assim, a comparação do peso do tumor foi realizada entre os grupos tratados com LNP-9-OVA e com CD11b-LNP-9-OVA (**Figura 20C**).

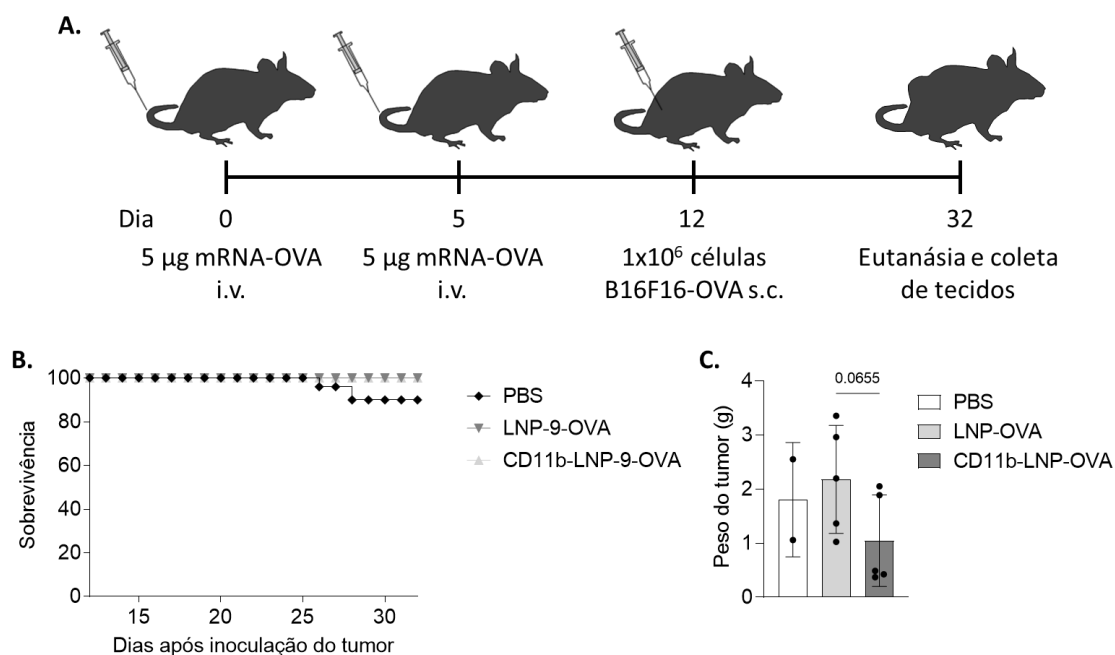


Figura 20: Efeito protetivo da vacina terapêutica de mRNA-OVA. **A.** Delineamento da imunização e indução de tumor *in vivo* com células B16F10-OVA. **B.** Curva de sobrevivência dos animais tratados com LNP ou com PBS a partir do dia da inoculação das células B16F10-OVA (dia 12). **C.** Peso dos tumores dissecados após 20 dias de crescimento. Grupos: PBS n=2; LNP-9-OVA n=5; CD11b-LNP-9-OVA n=5. p = 0,0655 avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

Apesar de não significativa (p=0,0655), a tendência na redução do tumor após o tratamento com a LNP funcionalizada indica que a apresentação do antígeno OVA foi eficaz em ativar células efectoras contra o tumor. A ativação de linfócitos foi analisada por citometria de fluxo após estimular a cultura de esplenócitos com OVA (**Anexo II**). A frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados (CD44⁺) foi significativamente maior nos animais tratados com LNPs quando comparados aos animais tratados com PBS (**Figura 21A**). Não foi observada nenhuma variação na frequência de linfócitos T CD8⁺ ativados no grupo tratado com PBS (**Figura 21B**). Avaliando a produção de citocinas induzida pelo estímulo *ex vivo* com OVA, observamos uma maior frequência de células CD4⁺ ativadas produzindo interferon gama (IFN γ), IL-10 e IL-17 nos animais tratados com a CD11b-LNP-9-OVA comparados com animais controle (**Figura 21C-E**). Animais tratados com LNP-9-OVA tiveram uma maior frequência de células CD4⁺ produzindo IL-10 e IL-17, mas esse aumento não foi observado para células produzindo IFN γ (**Figura 21C-E**). O mesmo padrão de produção de citocinas foi observado nos linfócitos T CD8⁺

ativados, maior frequência de células produzindo IFN γ , IL-10 e IL-17 nos animais tratados com a LNP funcionalizada (CD11b-LNP-9-OVA), em relação a animais controle (Figura 21F-H).

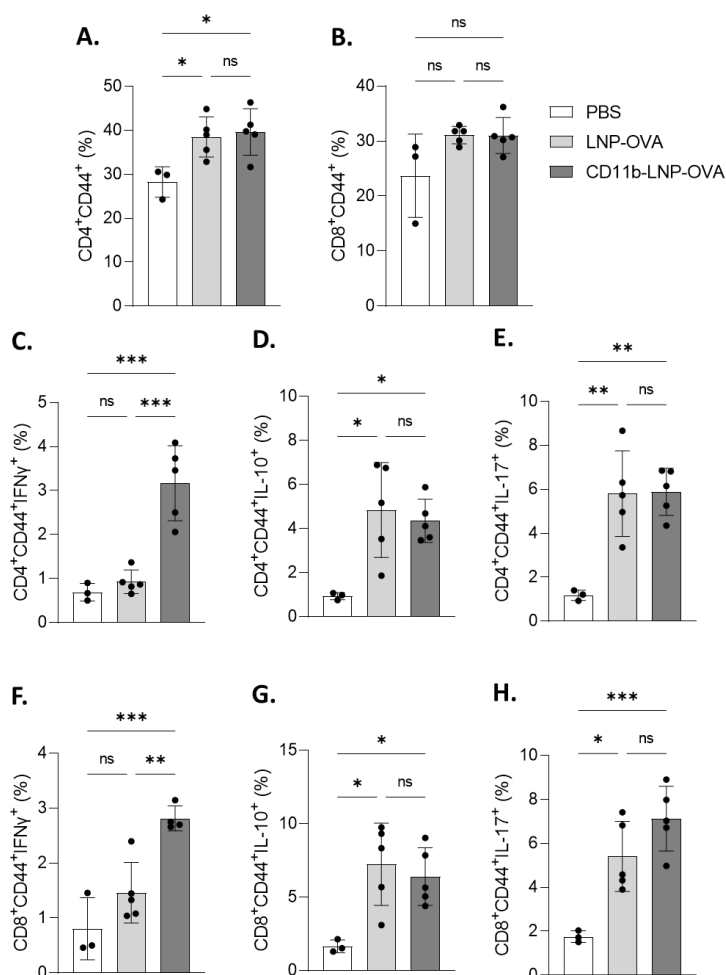


Figura 21: Ativação e produção de citocinas por células T CD4⁺ e CD8⁺. A. Frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados. **B.** Frequência de linfócitos T CD8⁺ ativados. **C-E.** Produção de IFN γ (C), IL-10 (D) e IL-17 (E) por linfócitos T CD4⁺. **F-H.** Produção de IFN γ (C), IL-10 (D) e IL-17 (E) por linfócitos T CD8⁺. * p<0,05; ** p<0.01; ***p<0.001; não significativo (ns) p>0.05 avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

As citocinas avaliadas estão envolvidas na resposta imune antitumoral no contexto do melanoma e outros tumores sólidos (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021). O aumento na frequência de células T produtoras de IFN γ sugere uma apresentação antigênica efetiva pela imunização com a LNP (CHEN; YE; HUANG; QIU *et al.*, 2022). Essa citocina é uma característica marcante de linfócitos T citotóxicos

(CD8⁺) no controle do desenvolvimento tumoral (JORGOVANOVIC; SONG; WANG; ZHANG, 2020). Em células de melanoma, o IFN γ induz uma mudança metabólica que afeta o crescimento tumoral, o que justifica seu efeito antitumoral quando produzida por linfócitos (CHATTOPADHYAY; JAGDISH; KARHALE; RAMTEKE *et al.*, 2023). Além do melanoma, o IFN γ demonstrou efeitos antitumorais em outros tumores sólidos, como mama, próstata, ovário e pulmão, com algumas aplicações clínicas (BHAT; GOYAL; THAPA; ALMALKI *et al.*, 2023).

A IL-10 apresenta um papel controverso na resposta imune antitumoral. Essa citocina já foi descrita pelo seu papel regulatório na imunossupressão associada à tumores (NIEDERKORN, 2008). No entanto, alguns estudos apontam que, também no contexto de tumores, a IL-10 é necessária no recrutamento e ativação de células citotóxicas como linfócitos T CD8 e células NK (MANNINO; ZHU; XIAO; BAI *et al.*, 2015). A expressão de IL-10 em melanomas contribui para imuno vigilância e controle do desenvolvimento tumoral. Em camundongos e humanos, a produção de IL-10 estava diretamente relacionada a produção de Granzima B e IFN γ , além de induzir a expansão de linfócitos T CD8⁺ (EMMERICH; MUMM; CHAN; LAFACE *et al.*, 2012; MUMM; EMMERICH; ZHANG; CHAN *et al.*, 2011).

Uma variedade de células imunes pode produzir IL-17 (linfócitos CD4 e CD8, células NK e T $\gamma\delta$), e desempenham funções antitumorais em modelo de melanoma induzido por células B16F10 (ANKATHATTI MUNEGOWDA; DENG; MULLIGAN; XIANG, 2011; COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021; CUPEDO; CRELLIN; PAPAIZIAN; ROMBOOTS *et al.*, 2009; MATSUO; ITOH; KOYAMA; IMAMURA *et al.*, 2016) e em modelo utilizando células expressando o antígeno OVA (CIRIC; EL-BEHI; CABRERA; ZHANG *et al.*, 2009). Em essência, a produção de IL-17 por linfócitos T é uma característica de células que contribuem para a resposta imune antitumoral preventiva e terapêutica em modelos animais (ANKATHATTI MUNEGOWDA; DENG; MULLIGAN; XIANG, 2011; KUEN; KIM; CHUNG, 2020; MURANSKI; BONI; ANTONY; CASSARD *et al.*, 2008; YU; CHO; WANG; KAOSAARD *et al.*, 2013). A ativação de linfócitos T e produção de citocinas indica a indução de resposta celular contra o melanoma após a imunização com a CD11b-LNP-9-OVA, contribuindo para a atividade antitumoral.

6.3.4. A resposta de células mieloides à imunização com LNP funcionalizada produz resposta celular antitumoral

Analisando as células mieloides (**Anexo III**), observamos um aumento na frequência de células dendríticas ($CD11b^+CD11c^+MHCII^+$) nos animais tratados com a LNP funcionalizada em relação ao controle, o que não foi observado em animais tratados com a LNP não funcionalizada (**Figura 22A**). A frequência de macrófagos ($CD11b^+F4/80^+Gr1^-$), neutrófilos ($CD11b^+F4/80^+Gr1^+$) e monócitos ($CD11b^+F4/80^+Gr1^+$) não foram alteradas pelos tratamentos (**Figura 22B-D**). Não observamos diferença na frequência de macrófagos expressando receptor de manose ($CD206$) (**Figura 22E e F**).

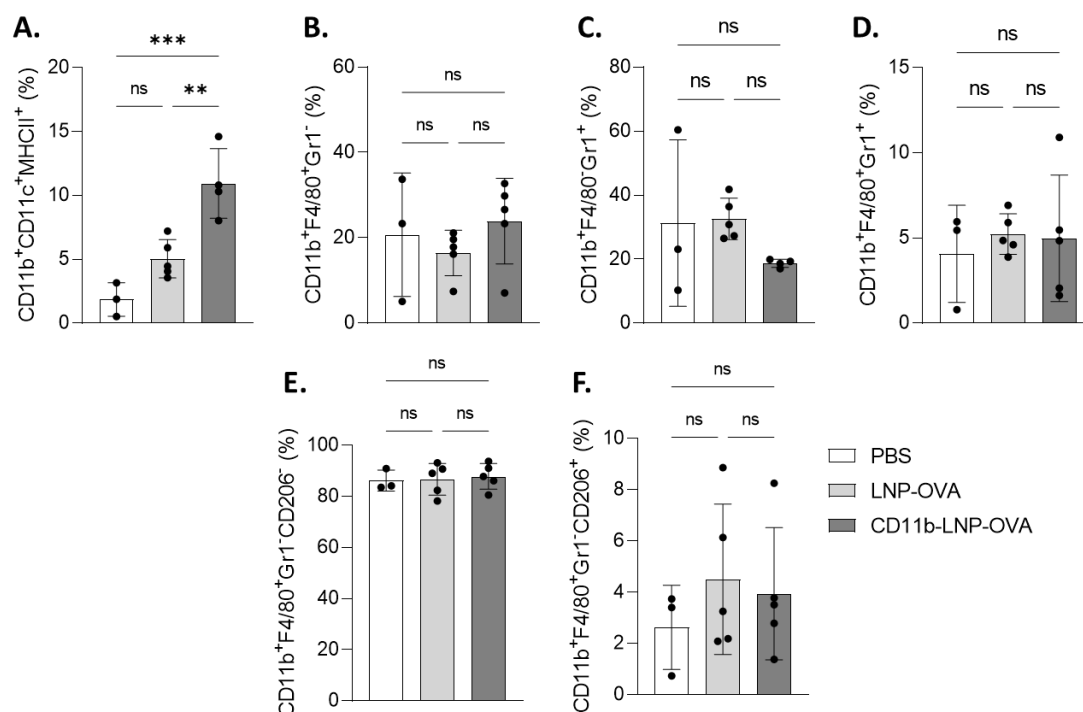


Figura 22: Frequência de células mieloides. A. Frequência de células dendríticas ($CD11b^+CD11c^+MHCII^+$). B. Frequência de macrófagos ($CD11b^+F4/80^+Gr1^-$). C. Frequência de neutrófilos ($CD11b^+F4/80^+Gr1^+$). D. Frequência de células monócitos ($CD11b^+F4/80^+Gr1^+$). E. Frequência de macrófagos $CD206^-$ ($CD11b^+F4/80^+Gr1^-CD206^-$). F. Frequência de macrófagos $CD206^+$ ($CD11b^+F4/80^+Gr1^-CD206^+$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; não significativo (ns) $p > 0.05$ avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média ± desvio padrão.

Avaliando a produção das citocinas IL-10, iNOS e TNF α por células dendríticas observamos uma redução frequência de células produzindo IL-10 nos animais tratados com a CD11b-LNP-9-OVA (**Figura 23A**). Não observamos diferença na frequência de células dendríticas produzindo as demais citocinas (**Figura 23B e C**).

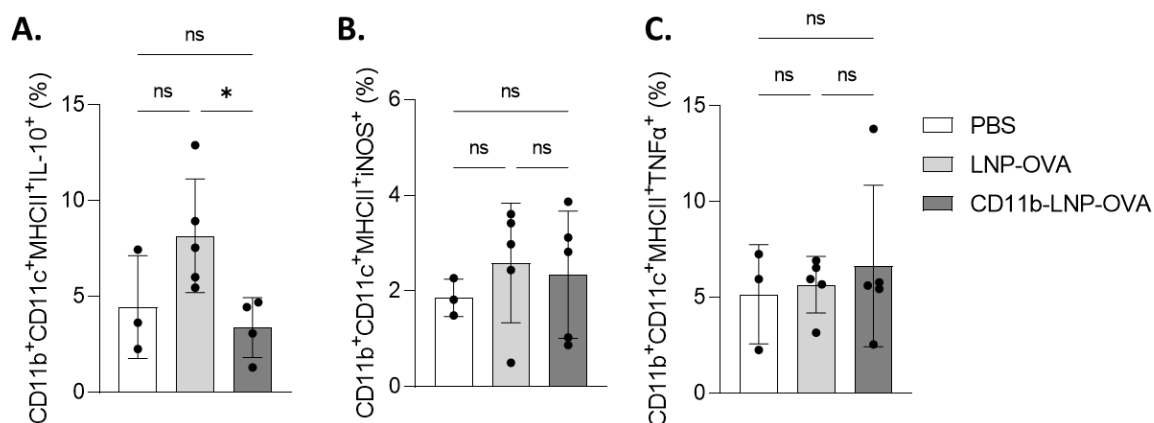


Figura 23: Produção de citocinas por células dendríticas. A-C. Produção de IL-10 (A), iNOS (B) e TNF α (C) por células dendríticas ($CD11b^+CD11c^+MHCII^+$). * $p < 0,05$; não significativo (ns) $p > 0,05$ avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média $\pm$ desvio padrão.

O tratamento com a CD11b-LNP-9-OVA aumentou a frequência de macrófagos expressando MHCII (**Figura 24A**). O tratamento tanto com a LNP funcionalizada quanto com a não funcionalizada reduziu a frequência de macrófagos MHCII $^+$ produzindo TNF α , sem alterar a frequência de células produzindo outras citocinas como IL-10 e iNOS (**Figura 24B-D**).

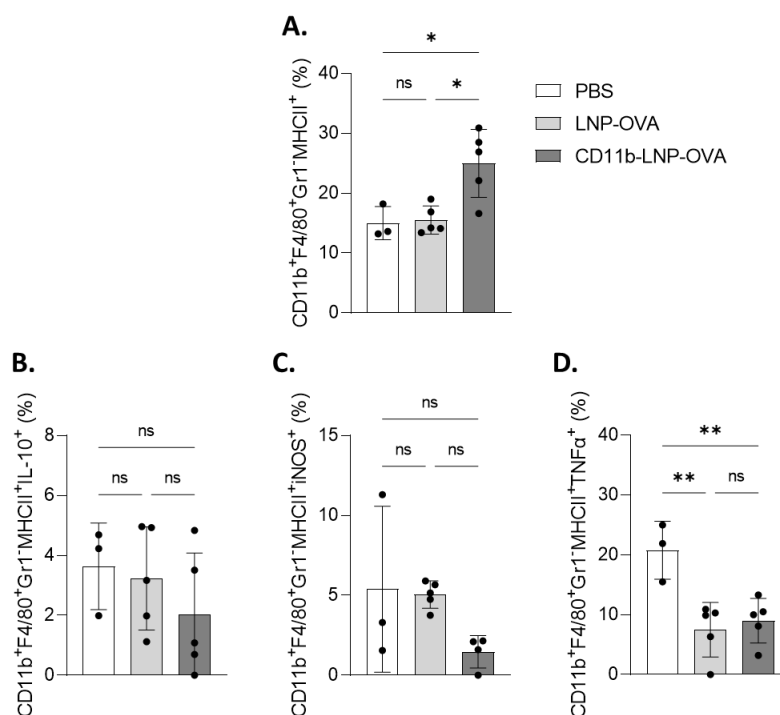


Figura 24: Frequência de macrófagos expressando MHCII e produção de citocinas.

A. Frequência de macrófagos expressando MHCII (CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺MHCII⁺). **B-D.** Produção de IL-10 (**B**), iNOS (**C**) e TNFα (**D**) por macrófagos expressando MHCII (CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺MHCII⁺). * p<0,05; ** p<0.01; não significativo (ns) p>0.05 avaliado por ANOVA one-way. Gráficos representados como média ± desvio padrão.

Em conjunto, os dados deste experimento piloto indicam que a LNP otimizada pelo nosso grupo pode ser utilizada como uma plataforma de entrega de mRNA direcionada ativamente pela funcionalização com anticorpo para células mieloides. Essa abordagem gerou uma resposta exclusivamente celular, com apresentação do antígeno via complexo MHCII (**Figuras 22A e 24A**) e resposta celular com produção principalmente de IFNγ e IL-17 (**Figura 21C, E, F e H**). Os dados gerados abrem perspectivas para novas funcionalizações das LNPs, permitindo a otimização de sistemas de entrega cada vez mais específicos. Esse direcionamento pode se tornar uma ferramenta interessante na produção de células CAR T *in vivo*, mas também na entrega de outras cargas, por exemplo, para edição gênica de linhagens celulares específicas.

A síntese da LNP para funcionalização pode ser aperfeiçoada. Por exemplo, neste trabalho todo o PEG da formulação foi substituído por PEG-Mal. Outros estudos sugerem que a substituição parcial do PEG favorece a entrega de mRNA *in vivo* (BILLINGSLEY; GONG; MUKALEL; THATTE *et al.*). Novos lipídeos ionizáveis, bem como outras

razões entre os lipídeos auxiliares podem ser projetados para favorecer o direcionamento da LNP para órgãos linfoides secundários (baço e linfonodo) ou terciários (por exemplo, tumores) (GUIMARAES; COSTA; SCALZO JUNIOR; FERREIRA *et al.*, 2024). Dependendo da necessidade, novas formulações podem ser funcionalizadas para uma entrega mais específica tanto para órgãos quanto para células (por exemplo, células apresentadoras de antígenos em linfonodos sentinela) (WANG; LIU; SUN; YU *et al.*, 2023). Dessa forma, novos estudos são necessários para estabelecer uma melhor relação entre a funcionalização de LNPs com anticorpos e sua atividade *in vivo* como vacinas terapêuticas. O processamento do anticorpo também deve ser avaliado com cautela antes da funcionalização das LNPs (HERRERA-BARRERA; RYALS; GAUTAM; JOZIC *et al.*, 2023). O tratamento de moléculas de IgG com enzimas específicas retira porções imunogênicas do anticorpo, podendo influenciar seu direcionamento e atividade *in vivo* (BEN MKADDEM; BENHAMOU; MONTEIRO, 2019). Dessa forma, a funcionalização pode ser utilizada como uma ferramenta para entregar diferentes cargas para células específicas, e ser aplicada como vacina terapêutica, na produção de células CAR T *in vivo* e inclusive na edição gênica.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com o trabalho publicado com os dados dessa tese, demonstramos que é possível utilizar LNPs na entrega de ácidos nucleicos para células imunes de forma eficaz. Na triagem de LNPs com variações na razão molar dos lipídeos auxiliares otimizamos uma formulação para entrega de DNA plasmidial para linfócitos. Essa metodologia possibilitou a produção de células CAR T contra tumores hematológicos CD19⁺. As células transformadas expressavam CAR de forma transiente e foram ativadas quando desafiadas com células alvo, induzindo a morte dessas células *in vitro*. A entrega de DNA por LNPs é um método rápido e eficaz de transformar linfócitos *ex vivo* com baixa toxicidade, e poderá ser explorada no futuro como método produtivo de células CAR T (PRAZERES; FERREIRA; COSTA; DA SILVA *et al.*, 2023).

A LNP otimizada pelo nosso grupo também foi capaz de entregar mRNA para linfócitos, produzindo células CAR T contra células de tumores sólidos. A entrega de mRNA por LNPs possibilita a aplicação dessa molécula tanto *in vitro* quanto *in vivo* com uma maior estabilidade e menor imunogenicidade (KARIKÓ; BUCKSTEIN; NI; WEISSMAN, 2005). A formulação utilizada nesse trabalho para encapsular mRNA foi

otimizada para entrega de pDNA para linfócitos. Nossos dados demonstram que a transfecção com mRNA utilizando essa plataforma produziu células CAR T funcionais contra células Colo-205 (carcinoma colorretal humano CLDN6⁺). A atividade dessas células deverá ser testada *in vivo*, utilizando animais NOD-scid IL2Rg^{null} (NSG) humanizados com PBMC de doadores saudáveis. Esse modelo já foi utilizado pelo nosso grupo para avaliar o efeito do tratamento com LNPs carreando mRNA para TRAIL no desenvolvimento de tumores induzidos por Colo-205 (Silva et al., 2024). Uma nova abordagem que pode ser testada na produção de células CAR T com mRNA é utilizar LNPs funcionalizadas com anticorpos para promover a transfecção e ativação concomitante dos linfócitos *ex vivo* (METZLOFF; PADILLA; GONG; BILLINGSLEY et al., 2024). A funcionalização de LNPs também pode ser explorada, em experimentos futuros, na transformação de linfócitos *in vivo*.

Com o experimento piloto utilizando a formulação funcionalizada com anti-CD11b demonstramos a captação da CD11b-LNP-9-OVA *in vitro*. No entanto, a captação dessa LNP *in vivo* será avaliada pelo nosso grupo para demonstrar para quais células da linhagem mieloide a carga está sendo melhor entregue. O efeito protetivo da LNP observado no modelo de melanoma foi limitado, podendo ser associado a dose de mRNA utilizada. Experimentos futuros focarão no ajuste da dose utilizada *in vivo*, bem como testar o efeito terapêutico dessa formulação, administrando a LNP como forma de controlar o crescimento do tumor. A ativação e produção de citocinas por linfócitos T, bem como a expressão de MHCII e produção de citocinas por células mieloides indicam que a LNP funcionalizada gerou resposta celular contra o antígeno OVA. Apesar de ser um modelo importante para o estudo da resposta imune antígeno específica, a OVA não é naturalmente expressa por tumores. Assim, antígenos tumorais devem ser avaliados como alvo de vacinas terapêuticas (CHEN; YE; HUANG; QIU et al., 2022). Isso pode ser facilitado pelo uso de LNPs direcionadas, uma vez que esses sistemas de entrega podem ser utilizados para encapsular diferentes mRNAs, construídos de acordo com a necessidade da aplicação.

8. PRODUÇÕES E PREMIAÇÕES

- Artigo relacionado a tese (**Anexo IV**) – Delivery of Plasmid DNA by Ionizable Lipid Nanoparticles to Induce CAR Expression in T Cells
- Auxílio viagem para congresso internacional (**Anexo V**) – Young Scientist Travel Award CRS
- Relevância acadêmica (**Anexo VI**) – Pôster nível doutorado XLVII congresso da SBI
- Artigo colaboração (**Anexo VII**) – siRNA lipid nanoparticles for CXCL12 silencing modulate brain immune response during Zika infection
- Artigo colaboração (**Anexo VII**) – In situ triggered, floating delivery systems of capsaicin for prolonged gastroprotection
- Artigo colaboração (**Anexo IX**) – Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated TRAIL mRNA Delivery in the Tumor Microenvironment to Inhibit Colon Cancer Progression (proof aceita para publicação)
- Patente relacionada a tese (**Anexo X**) – Composições para entrega seletiva de DNA ou DNA plasmidial em linfócitos T, e uso

9. REFERÊNCIAS

- ABATE-DAGA, D.; DAVILA, M. L. CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. **Molecular therapy oncolytics**, 3, p. 16014-16014, 2016.
- AHMAD, A.; UDDIN, S.; STEINHOFF, M. CAR-T Cell Therapies: An Overview of Clinical Studies Supporting Their Approved Use against Acute Lymphoblastic Leukemia and Large B-Cell Lymphomas. **Int J Mol Sci**, 21, n. 11, May 30 2020.
- AHMED, S.; RAI, K. R. Interferon in the treatment of hairy-cell leukemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, 16, n. 1, p. 69-81, Mar 2003.
- AKINC, A.; MAIER, M. A.; MANOHARAN, M.; FITZGERALD, K. *et al.* The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. **Nature Nanotechnology**, 14, n. 12, p. 1084-1087, 2019/12/01 2019.
- ALABANZA, L.; PEGUES, M.; GELDRES, C.; SHI, V. *et al.* Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. **Mol Ther**, 25, n. 11, p. 2452-2465, Nov 1 2017.
- ALGHAMDI, M. A.; FALLICA, A. N.; VIRZÌ, N.; KESHARWANI, P. *et al.* The Promise of Nanotechnology in Personalized Medicine. **J Pers Med**, 12, n. 5, Apr 22 2022.
- ALSAAB, H. O.; SAU, S.; ALZHRANI, R.; TATIPARTI, K. *et al.* PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. **Front Pharmacol**, 8, p. 561, 2017.
- ALWAN, L. M.; GROSSMANN, K.; SAGESER, D.; VAN ATTA, J. *et al.* Comparison of acute toxicity and mortality after two different dosing regimens of high-dose interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. **Target Oncol**, 9, n. 1, p. 63-71, Mar 2014.
- ANKATHATTI MUNEGOWDA, M.; DENG, Y.; MULLIGAN, S. J.; XIANG, J. Th17 and Th17-stimulated CD8⁺ T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. **Cancer Immunol Immunother**, 60, n. 10, p. 1473-1484, Oct 2011.
- ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. Nanoparticles in the clinic: An update. **Bioengineering & translational medicine**, 4, n. 3, p. e10143-e10143, 2019.
- ANVISA. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/sangue/terapias-avancadas/produtos-registrados>. 2020. Acesso em: 19/02/2024.

ANVISA. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-3o-produto-de-terapia-avancada-para-tratamento-do-cancer>. 2022a. Acesso em: 19/02/2024.

ANVISA. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-produto-de-terapia-avancada-para-tratamento-de-cancer>. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-produto-de-terapia-avancada-para-tratamento-de-cancer>. Acesso em: July, 23.

ANVISA. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-mais-um-produto-de-terapia-avancada-para-tratamento-do-cancer-no-brasil#:~:text=O%20TECARTUS%C2%AE%20%C3%A9%20o%20quarto%20produto%20de%20terapia%20g%C3%AAnica,avan%C3%A7adas%2C%20atuando%20como%20imunoterapias%20personalizadas.,> 2023. Acesso em: 19/02/2024.

ASMAMAW DEJENIE, T.; TIRUNEH, G. M. M.; DESSIE TEREFE, G.; TADELE ADMASU, F. *et al.* Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy. **Hum Vaccin Immunother**, 18, n. 6, p. 2114254, Nov 30 2022.

AU - EL-MAYTA, R.; AU - PADILLA, M. S.; AU - BILLINGSLEY, M. M.; AU - HAN, X. *et al.* Testing the In Vitro and In Vivo Efficiency of mRNA-Lipid Nanoparticles Formulated by Microfluidic Mixing. **JoVE**, n. 191, p. e64810, 2023/01/20/ 2023.

BAGHBAN, R.; ROSHANGAR, L.; JAHANBAN-ESFAHLAN, R.; SEIDI, K. *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling**, 18, p. 1-19, 2020.

BANIYASH, M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. **Nat Rev Immunol**, 4, n. 9, p. 675-687, Sep 2004.

BEN MKADDEM, S.; BENHAMOU, M.; MONTEIRO, R. C. Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. **Frontiers in Immunology**, 10, 2019-April-12 2019. Review.

BHAT, A. A.; GOYAL, A.; THAPA, R.; ALMALKI, W. H. *et al.* Uncovering the complex role of interferon-gamma in suppressing type 2 immunity to cancer. **Cytokine**, 171, p. 156376, 2023/11/01/ 2023.

BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. II. The origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, 143, n. 910, p. 58-80, Dec 15 1954.

BILLINGSLEY, M. M.; GONG, N.; MUKALEL, A. J.; THATTE, A. S. *et al.* In Vivo mRNA CAR T Cell Engineering via Targeted Ionizable Lipid Nanoparticles with Extrahepatic Tropism. **Small**, n/a, n. n/a, p. 2304378.

BILLINGSLEY, M. M.; HAMILTON, A. G.; MAI, D.; PATEL, S. K. *et al.* Orthogonal Design of Experiments for Optimization of Lipid Nanoparticles for mRNA Engineering of CAR T Cells. **Nano Letters**, 22, n. 1, p. 533-542, 2022/01/12 2022.

BILLINGSLEY, M. M.; SINGH, N.; RAVIKUMAR, P.; ZHANG, R. *et al.* Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering. **Nano letters**, 20, n. 3, p. 1578-1589, 2020.

BLOEMBERG, D.; NGUYEN, T.; MACLEAN, S.; ZAFER, A. *et al.* A high-throughput method for characterizing novel chimeric antigen receptors in jurkat cells. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, 16, p. 238-254, 2020.

BOUCHER, Y.; POSADA, J. M.; SUBUDHI, S.; KUMAR, A. S. *et al.* Addition of Losartan to FOLFIRINOX and Chemoradiation Reduces Immunosuppression-Associated Genes, Tregs, and FOXP3+ Cancer Cells in Locally Advanced Pancreatic Cancer. **Clin Cancer Res**, 29, n. 8, p. 1605-1619, Apr 14 2023.

BRITTEN, O.; RAGUSA, D.; TOSI, S.; MOSTAFA KAMEL, Y. MLL-Rearranged Acute Leukemia with t(4;11)(q21;q23)—Current Treatment Options. Is There a Role for CAR-T Cell Therapy? **Cells**, 8, n. 11, p. 1341, 2019.

BURGER, J. A.; KEATING, M. J.; WIERDA, W. G.; HARTMANN, E. *et al.* Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. **The Lancet Oncology**, 15, n. 10, p. 1090-1099, 2014.

BURGER, J. A.; O'BRIEN, S. Evolution of CLL treatment — from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 15, n. 8, p. 510-527, 2018/08/01 2018.

CAO, S.; JIANG, Y.; LEVY, C. N.; HUGHES, S. M. *et al.* Optimization and comparison of CD4-targeting lipid-polymer hybrid nanoparticles using different binding ligands. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 106, n. 5, p. 1177-1188, 2018.

CAPPELL, K. M.; KOCHENDERFER, J. N. A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 18, n. 11, p. 715-727, 2021/11/01 2021.

CARPENITO, C.; MILONE, M. C.; HASSAN, R.; SIMONET, J. C. *et al.* Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106, n. 9, p. 3360-3365, 2009.

CASTELLARIN, M.; SANDS, C.; DA, T.; SCHOLLER, J. *et al.* A rational mouse model to detect on-target, off-tumor CAR T cell toxicity. **JCI Insight**, 5, n. 14, 07/23/ 2020.

CENGIZ, B.; EJDERYAN, N.; SANYAL, A. Functional polymeric coatings: thiol-maleimide ‘click’ chemistry as a powerful surface functionalization tool. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, 59, n. 7, p. 443-455, 2022/07/03 2022.

CHAILYAN, A.; MARCATILI, P.; TRAMONTANO, A. The association of heavy and light chain variable domains in antibodies: implications for antigen specificity. **Febs j**, 278, n. 16, p. 2858-2866, Aug 2011.

CHATTOPADHYAY, A.; JAGDISH, S.; KARHALE, A. K.; RAMTEKE, N. S. *et al.* IFN- γ lowers tumor growth by increasing glycolysis and lactate production in a nitric oxide-dependent manner: implications for cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, 14, 2023-October-27 2023. Original Research.

CHEN, J.; YE, Z.; HUANG, C.; QIU, M. *et al.* Lipid nanoparticle-mediated lymph node-targeting delivery of mRNA cancer vaccine elicits robust CD8(+) T cell response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 119, n. 34, p. e2207841119, Aug 23 2022.

CHENG, X.; LEE, R. J. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 99, p. 129-137, 2016/04/01/ 2016.

CHICAYBAM, L.; ABDO, L.; VIEGAS, M.; MARQUES, L. V. C. *et al.* Transposon-mediated generation of CAR-T cells shows efficient anti B-cell leukemia response after ex vivo expansion. **Gene Ther**, 27, n. 1-2, p. 85-95, Feb 2020.

CIRIC, B.; EL-BEHI, M.; CABRERA, R.; ZHANG, G.-X. *et al.* IL-23 Drives Pathogenic IL-17-Producing CD8⁺ T Cells¹. **The Journal of Immunology**, 182, n. 9, p. 5296-5305, 2009.

COILLARD, A.; SEGURA, E. Antigen presentation by mouse monocyte-derived cells: Re-evaluating the concept of monocyte-derived dendritic cells. **Molecular Immunology**, 135, p. 165-169, 2021/07/01/ 2021.

COSTA, P. A. C.; DA SILVA, W. N.; MOURA PRAZERES, P. H. D.; FERREIRA, H. A. S. *et al.* siRNA lipid nanoparticles for CXCL12 silencing modulate brain immune response during Zika infection. **Biomed Pharmacother**, 170, p. 115981, Jan 2024.

COSTA, P. A. C.; SILVA, W. N.; PRAZERES, P.; PICOLI, C. C. *et al.* Chemogenetic modulation of sensory neurons reveals their regulating role in melanoma progression. **Acta Neuropathol Commun**, 9, n. 1, p. 183, Nov 16 2021.

COUZIN-FRANKEL, J. Cancer Immunotherapy. **Science**, 342, n. 6165, p. 1432-1433, 2013.

CUPEDO, T.; CRELLIN, N. K.; PAPAZIAN, N.; ROMBOUTS, E. J. *et al.* Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. **Nat Immunol**, 10, n. 1, p. 66-74, Jan 2009.

DA SILVA SANCHEZ, A. J.; ZHAO, K.; HUAYAMARES, S. G.; HATIT, M. Z. C. *et al.* Substituting racemic ionizable lipids with stereopure ionizable lipids can increase mRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, 353, p. 270-277, 2023/01/01/ 2023.

DE MACEDO ABDO, L.; BARROS, L. R. C.; SALDANHA VIEGAS, M.; VIEIRA CODEÇO MARQUES, L. *et al.* Development of CAR-T cell therapy for B-ALL using a point-of-care approach. **Oncoimmunology**, 9, n. 1, p. 1752592, 2020.

DUONG, C. P. M.; WESTWOOD, J. A.; YONG, C. S. M.; MURPHY, A. *et al.* Engineering T Cell Function Using Chimeric Antigen Receptors Identified Using a DNA Library Approach. **PLOS ONE**, 8, n. 5, p. e63037, 2013.

EDELINE, J.; HOUOT, R.; MARABELLE, A.; ALCANTARA, M. CAR-T cells and BiTEs in solid tumors: challenges and perspectives. **Journal of Hematology & Oncology**, 14, n. 1, p. 65, 2021/04/19 2021.

EMMERICH, J.; MUMM, J. B.; CHAN, I. H.; LAFACE, D. *et al.* IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. **Cancer Res**, 72, n. 14, p. 3570-3581, Jul 15 2012.

FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. **International journal of nanomedicine**, 10, p. 4981-5003, 2015.

GARRIDO, F.; APTSIAURI, N. Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases. **Immunology**, 158, n. 4, p. 255-266, 2019.

GARRIDO, F.; APTSIAURI, N.; DOORDUIJN, E. M.; GARCIA LORA, A. M. *et al.* The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. **Curr Opin Immunol**, 39, p. 44-51, Apr 2016.

GOEDE, V.; FISCHER, K.; BUSCH, R.; ENGELKE, A. *et al.* Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. **New England Journal of Medicine**, 370, n. 12, p. 1101-1110, 2014.

GOMES, L. C.; EVANGELISTA, F. C. G.; SOUSA, L. P.; ARAUJO, S. *et al.* Prognosis biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, 10, n. 2, p. 57-62, Jun 2017.

GONG, N.; SHEPPARD, N. C.; BILLINGSLEY, M. M.; JUNE, C. H. *et al.* Nanomaterials for T-cell cancer immunotherapy. **Nature Nanotechnology**, 16, n. 1, p. 25-36, 2021/01/01 2021.

GRILLO-LÓPEZ, A. J.; WHITE, C. A.; DALLAIRE, B. K.; VARNS, C. L. *et al.* Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. **Curr Pharm Biotechnol**, 1, n. 1, p. 1-9, Jul 2000.

GUIMARAES, L. C.; COSTA, P. A. C.; SCALZO JUNIOR, S. R. A.; FERREIRA, H. A. S. *et al.* Nanoparticle-based DNA vaccine protects against SARS-CoV-2 variants in female preclinical models. **Nat Commun**, 15, n. 1, p. 590, Jan 18 2024.

GUIMARÃES, P. P.; FIGUEROA-ESPADA, C. G.; RILEY, R. S.; GONG, N. *et al.* In vivo bone marrow microenvironment siRNA delivery using lipid-polymer nanoparticles for multiple myeloma therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 120, n. 25, p. e2215711120, 2023.

GUIMARAES, P. P.; ZHANG, R.; SPEKTOR, R.; TAN, M. *et al.* Ionizable lipid nanoparticles encapsulating barcoded mRNA for accelerated in vivo delivery screening. **Journal of Controlled Release**, 316, p. 404-417, 2019.

GUZMAN, G.; REED, M. R.; BIELAMOWICZ, K.; KOSS, B. *et al.* CAR-T Therapies in Solid Tumors: Opportunities and Challenges. **Curr Oncol Rep**, 25, n. 5, p. 479-489, May 2023.

HALLEK, M.; SHANAFELT, T. D.; EICHHORST, B. Chronic lymphocytic leukaemia. **The Lancet**, 391, n. 10129, p. 1524-1537, 2018/04/14/ 2018.

HAN, X.; XU, J.; XU, Y.; ALAMEH, M.-G. *et al.* In situ combinatorial synthesis of degradable branched lipidoids for systemic delivery of mRNA therapeutics and gene editors. **Nature Communications**, 15, n. 1, p. 1762, 2024/02/26 2024.

HERISHANU, Y.; PÉREZ-GALÁN, P.; LIU, D.; BIANCOTTO, A. *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, 117, n. 2, p. 563-574, 2011.

HERRERA-BARRERA, M.; RYALS, R. C.; GAUTAM, M.; JOZIC, A. *et al.* Peptide-guided lipid nanoparticles deliver mRNA to the neural retina of rodents and nonhuman primates. **Science Advances**, 9, n. 2, p. eadd4623, 2023.

HODI, F. S.; O'DAY, S. J.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, 363, n. 8, p. 711-723, Aug 19 2010.

HOU, X.; ZAKS, T.; LANGER, R.; DONG, Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**, 6, n. 12, p. 1078-1094, 2021/12/01 2021.

HUANG, P. W.; CHANG, J. W. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. **Biomed J**, 42, n. 5, p. 299-306, Oct 2019.

HUANG, X.; KON, E.; HAN, X.; ZHANG, X. *et al.* Nanotechnology-based strategies against SARS-CoV-2 variants. **Nature Nanotechnology**, 2022/08/18 2022.

HUANG, X.; KONG, N.; ZHANG, X.; CAO, Y. *et al.* The landscape of mRNA nanomedicine. **Nature Medicine**, 28, n. 11, p. 2273-2287, 2022/11/01 2022.

HUAYAMARES, S. G.; LOKUGAMAGE, M. P.; RAB, R.; DA SILVA SANCHEZ, A. J. *et al.* High-throughput screens identify a lipid nanoparticle that preferentially delivers mRNA to human tumors in vivo. **Journal of Controlled Release**, 357, p. 394-403, 2023/05/01/ 2023.

HUDECEK, M.; SOMMERMEYER, D.; KOSASIH, P. L.; SILVA-BENEDICT, A. *et al.* The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. **Cancer Immunol Res**, 3, n. 2, p. 125-135, Feb 2015.

INCA, M. d. S. Estimativa 2023 - Incidência de Câncer no Brasil. 2023.

INOUE, T.; SWAIN, A.; NAKANISHI, Y.; SUGIYAMA, D. Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. **Anticancer research**, 34, n. 8, p. 4539-4550, 2014.

IRVINE, D. J.; DANE, E. L. Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine. **Nature Reviews Immunology**, 20, n. 5, p. 321-334, 2020/05/01 2020.

JABBOUR, E.; O'BRIEN, S.; KONOPLEVA, M.; KANTARJIAN, H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, 121, n. 15, p. 2517-2528, 2015.

JAIN, R. K.; SKELTON IV, W. P.; POND, G. R.; NAQVI, M. *et al.* Angiotensin Blockade Modulates the Activity of PD1/L1 Inhibitors in Metastatic Urothelial Carcinoma. **Clin Genitourin Cancer**, 19, n. 6, p. 540-546, Dec 2021.

JENSEN, M. C.; POPPLEWELL, L.; COOPER, L. J.; DIGIUSTO, D. *et al.* Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. **Biol Blood Marrow Transplant**, 16, n. 9, p. 1245-1256, Sep 2010.

JIANG, X.; SHEN, C.; REY-LADINO, J.; YU, H. *et al.* Characterization of Murine Dendritic Cell Line JAWS II and Primary Bone Marrow-Derived Dendritic Cells in *Chlamydia muridarum* Antigen Presentation and Induction of Protective Immunity. **Infection and Immunity**, 76, n. 6, p. 2392-2401, 2008.

JIN, M.-Z.; JIN, W.-L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. **Signal transduction and targeted therapy**, 5, n. 1, p. 166, 2020.

JOHNSON, L. A.; MORGAN, R. A.; DUDLEY, M. E.; CASSARD, L. *et al.* Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. **Blood**, 114, n. 3, p. 535-546, 2009.

JORGOVANOVIC, D.; SONG, M.; WANG, L.; ZHANG, Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. **Biomark Res**, 8, p. 49, 2020.

JUNE, C. H.; O'CONNOR, R. S.; KAWALEKAR, O. U.; GHASSEMI, S. *et al.* CAR T cell immunotherapy for human cancer. **Science**, 359, n. 6382, p. 1361-1365, 2018.

JUNE, C. H.; RIDDELL, S. R.; SCHUMACHER, T. N. Adoptive cellular therapy: a race to the finish line. **Sci Transl Med**, 7, n. 280, p. 280ps287, Mar 25 2015.

JUNE, C. H.; WARSHAUER, J. T.; BLUESTONE, J. A. Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy? **Nat Med**, 23, n. 5, p. 540-547, May 5 2017.

KANTOFF, P. W.; HIGANO, C. S.; SHORE, N. D.; BERGER, E. R. *et al.* Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, 363, n. 5, p. 411-422, 2010.

- KARIKÓ, K.; BUCKSTEIN, M.; NI, H.; WEISSMAN, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. **Immunity**, 23, n. 2, p. 165-175, Aug 2005.
- KORELL, F.; BERGER, T. R.; MAUS, M. V. Understanding CAR T cell-tumor interactions: Paving the way for successful clinical outcomes. **Med**, 3, n. 8, p. 538-564, Aug 12 2022.
- KROHN-GRIMBERGHE, M.; MITCHELL, M. J.; SCHLOSS, M. J.; KHAN, O. F. *et al.* Nanoparticle-encapsulated siRNAs for gene silencing in the haematopoietic stem-cell niche. **Nature Biomedical Engineering**, 4, n. 11, p. 1076-1089, 2020/11/01 2020.
- KUBLI, S. P.; BERGER, T.; ARAUJO, D. V.; SIU, L. L. *et al.* Beyond immune checkpoint blockade: emerging immunological strategies. **Nature Reviews Drug Discovery**, 20, n. 12, p. 899-919, 2021/12/01 2021.
- KUEN, D. S.; KIM, B. S.; CHUNG, Y. IL-17-Producing Cells in Tumor Immunity: Friends or Foes? **Immune Netw**, 20, n. 1, p. e6, Feb 2020.
- KUWANA, Y.; ASAKURA, Y.; UTSUNOMIYA, N.; NAKANISHI, M. *et al.* Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. **Biochemical and biophysical research communications**, 149, n. 3, p. 960-968, 1987.
- LARSON, R. C.; MAUS, M. V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. **Nat Rev Cancer**, 21, n. 3, p. 145-161, Mar 2021.
- LI, J. Context-Dependent Roles of Claudins in Tumorigenesis. **Frontiers in Oncology**, 11, 2021-July-20 2021. Review.
- LI, L.; GOEDEGEBUURE, S. P.; GILLANDERS, W. E. Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines. **Ann Oncol**, 28, n. suppl_12, p. xii11-xii17, Dec 1 2017.
- LIU, J. Q.; ZHANG, C.; ZHANG, X.; YAN, J. *et al.* Intratumoral delivery of IL-12 and IL-27 mRNA using lipid nanoparticles for cancer immunotherapy. **J Control Release**, 345, p. 306-313, May 2022.
- LIU, M. A. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. **Vaccines**, 7, n. 2, p. 37, 2019.
- LIU, Y.; CHEN, X.; HAN, W.; ZHANG, Y. Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia. **Drugs Today (Barc)**, 53, n. 11, p. 597-608, Nov 2017.

LOPRESTI, S. T.; ARRAL, M. L.; CHAUDHARY, N.; WHITEHEAD, K. A. The replacement of helper lipids with charged alternatives in lipid nanoparticles facilitates targeted mRNA delivery to the spleen and lungs. **J Control Release**, 345, p. 819-831, May 2022.

LUO, Z.; YAO, X.; LI, M.; FANG, D. *et al.* Modulating Tumor Physical Microenvironment for Fueling CAR-T Cell Therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 114301, 2022.

MA, H.; PADMANABHAN IYER, S.; PARMAR, S.; GONG, Y. Adoptive cell therapy for acute myeloid leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, 60, n. 6, p. 1370-1380, 2019/05/12 2019.

MA, Y.; FENTON, O. S. Tannic Acid Lipid Nanoparticles can Deliver Messenger RNA Payloads and Improve their Endosomal Escape. **Advanced Therapeutics**, 6, n. 6, p. 2200305, 2023.

MAJZNER, R. G.; RIETBERG, S. P.; SOTILLO, E.; DONG, R. *et al.* Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. **Cancer discovery**, 10, n. 5, p. 702-723, 2020.

MANNINO, M. H.; ZHU, Z.; XIAO, H.; BAI, Q. *et al.* The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Lett**, 367, n. 2, p. 103-107, Oct 28 2015.

MATSUO, K.; ITOH, T.; KOYAMA, A.; IMAMURA, R. *et al.* CCR4 is critically involved in effective antitumor immunity in mice bearing intradermal B16 melanoma. **Cancer Lett**, 378, n. 1, p. 16-22, Aug 1 2016.

MAUDE, S. L.; FREY, N.; SHAW, P. A.; APLENC, R. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. **N Engl J Med**, 371, n. 16, p. 1507-1517, Oct 16 2014.

MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, 480, n. 7378, p. 480-489, 2011/12/01 2011.

MERAD, M.; SATHE, P.; HELFT, J.; MILLER, J. *et al.* The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, 31, p. 563-604, 2013.

METZLOFF, A. E.; PADILLA, M. S.; GONG, N.; BILLINGSLEY, M. M. *et al.* Antigen Presenting Cell Mimetic Lipid Nanoparticles for Rapid mRNA CAR T Cell Cancer Immunotherapy. **Adv Mater**, p. e2313226, Feb 28 2024.

MILIOTOU, A. N.; PAPADOPOULOU, L. C. In Vitro-Transcribed (IVT)-mRNA CAR Therapy Development. **Methods Mol Biol**, 2086, p. 87-117, 2020.

MITCHELL, M. J.; BILLINGSLEY, M. M.; HALEY, R. M.; WECHSLER, M. E. *et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, 20, n. 2, p. 101-124, 2021/02/01 2021.

MOUGIAKAKOS, D.; KRÖNKE, G.; VÖLKL, S.; KRETSCHMANN, S. *et al.* CD19-Targeted CAR T Cells in Refractory Systemic Lupus Erythematosus. **N Engl J Med**, 385, n. 6, p. 567-569, Aug 5 2021.

MUMM, J. B.; EMMERICH, J.; ZHANG, X.; CHAN, I. *et al.* IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. **Cancer Cell**, 20, n. 6, p. 781-796, Dec 13 2011.

MURANSKI, P.; BONI, A.; ANTONY, P. A.; CASSARD, L. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, 112, n. 2, p. 362-373, 2008.

NIEDERKORN, J. Y. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. **Curr Opin Immunol**, 20, n. 3, p. 327-331, Jun 2008.

OTANI, T.; FURUSE, M. Tight junction structure and function revisited. **Trends in cell biology**, 30, n. 10, p. 805-817, 2020.

PARDI, N.; HOGAN, M. J.; PORTER, F. W.; WEISSMAN, D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. **Nat Rev Drug Discov**, 17, n. 4, p. 261-279, Apr 2018.

PARKER, K. R.; MIGLIORINI, D.; PERKEY, E.; YOST, K. E. *et al.* Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. **Cell**, 183, n. 1, p. 126-142.e117, 2020/10/01/ 2020.

PATEL, S. K.; BILLINGSLEY, M. M.; FRAZEE, C.; HAN, X. *et al.* Hydroxycholesterol substitution in ionizable lipid nanoparticles for mRNA delivery to T cells. **Journal of Controlled Release**, 347, p. 521-532, 2022/07/01/ 2022.

PAWELEC, G.; BOROWITZ, A.; KRAMMER, P. H.; WERNET, P. Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. **Eur J Immunol**, 12, n. 5, p. 387-392, May 1982.

PAWLUCZKOWYCZ, A. W.; BEURSKENS, F. J.; BEUM, P. V.; LINDORFER, M. A. *et al.* Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. **The Journal of Immunology**, 183, n. 1, p. 749-758, 2009.

PRAZERES, P. H. D. M.; FERREIRA, H.; COSTA, P. A. C.; DA SILVA, W. *et al.* Delivery of Plasmid DNA by Ionizable Lipid Nanoparticles to Induce CAR Expression in T Cells. **International Journal of Nanomedicine**, 18, n. null, p. 5891-5904, 2023/12/31 2023.

QIU, M.; TANG, Y.; CHEN, J.; MURIPH, R. *et al.* Lung-selective mRNA delivery of synthetic lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary lymphangioleiomyomatosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 119, n. 8, p. e2116271119, 2022.

QU, H.; JIN, Q.; QUAN, C. CLDN6: From Traditional Barrier Function to Emerging Roles in Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 24, p. 13416, 2021.

RAWSTRON, A. C.; KREUZER, K. A.; SOOSAPILLA, A.; SPACEK, M. *et al.* Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, 94, n. 1, p. 121-128, 2018.

REEVES, M. Q.; KANDYBA, E.; HARRIS, S.; DEL ROSARIO, R. *et al.* Multicolour lineage tracing reveals clonal dynamics of squamous carcinoma evolution from initiation to metastasis. **Nat Cell Biol**, 20, n. 6, p. 699-709, Jun 2018.

REINHARD, K.; RENGSTL, B.; OEHM, P.; MICHEL, K. *et al.* An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors. **Science**, 367, n. 6476, p. 446-453, Jan 24 2020.

RESTIFO, N. P.; SMYTH, M. J.; SNYDER, A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. **Nat Rev Cancer**, 16, n. 2, p. 121-126, Feb 2016.

RIEDL, S. A. B.; KAISER, P.; RAUP, A.; SYNATSCHKE, C. V. *et al.* Non-Viral Transfection of Human T Lymphocytes. **Processes**, 6, n. 10, p. 188, 2018.

RILEY, R. S.; JUNE, C. H.; LANGER, R.; MITCHELL, M. J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, 18, n. 3, p. 175-196, 2019/03/01 2019.

ROSENBERG, S. A. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. **J Immunol**, 192, n. 12, p. 5451-5458, Jun 15 2014.

ROSENBERG, S. A.; RESTIFO, N. P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. **Science**, 348, n. 6230, p. 62-68, 2015.

RURIK, J. G.; TOMBÁČZ, I.; YADEGARI, A.; MÉNDEZ FERNÁNDEZ, P. O. *et al.* CAR T cells produced in vivo to treat cardiac injury. **Science**, 375, n. 6576, p. 91-96, Jan 7 2022.

SAKURAI, Y.; ABE, N.; YOSHIKAWA, K.; OYAMA, R. *et al.* Targeted delivery of lipid nanoparticle to lymphatic endothelial cells via anti-podoplanin antibody. **J Control Release**, 349, p. 379-387, Sep 2022.

SAVOLDO, B.; RAMOS, C. A.; LIU, E.; MIMS, M. P. *et al.* CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. **J Clin Invest**, 121, n. 5, p. 1822-1826, May 2011.

SCALZO, S.; SANTOS, A. K.; FERREIRA, H. A.; COSTA, P. A. *et al.* Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of Plasmid DNA in Cardiomyocytes. **International Journal of Nanomedicine**, 17, p. 2865-2881, 2022.

SCHAFT, N. The Landscape of CAR-T Cell Clinical Trials against Solid Tumors—A Comprehensive Overview. **Cancers**, 12, n. 9, p. 2567, 2020.

SCHNEIDER, U.; SCHWENK, H. U.; BORNKAMM, G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. **Int J Cancer**, 19, n. 5, p. 621-626, May 15 1977.

SEOW, Y.; WOOD, M. J. Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors. **Molecular Therapy**, 17, n. 5, p. 767-777, 2009/05/01/ 2009.

SEYMOUR, J. F.; KIPPS, T. J.; EICHHORST, B.; HILLMEN, P. *et al.* Venetoclax–Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, 378, n. 12, p. 1107-1120, 2018.

SHEPHERD, S. J.; ISSADORE, D.; MITCHELL, M. J. Microfluidic formulation of nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, 274, p. 120826, 2021/07/01/ 2021.

SHI, J.; KANTOFF, P. W.; WOOSTER, R.; FAROKHZAD, O. C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nat Rev Cancer**, 17, n. 1, p. 20-37, Jan 2017.

SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Estimativa 2020 - Incidência de câncer no Brasil. 2020.

SONG, W.; MUSETTI, S. N.; HUANG, L. Nanomaterials for cancer immunotherapy. **Biomaterials**, 148, p. 16-30, 2017/12/01/ 2017.

SOUNDARA RAJAN, T.; GUGLIANDOLO, A.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. In Vitro-Transcribed mRNA Chimeric Antigen Receptor T Cell (IVT mRNA CAR T) Therapy in Hematologic and Solid Tumor Management: A Preclinical Update. **Int J Mol Sci**, 21, n. 18, Sep 6 2020.

STERNER, R. C.; STERNER, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. **Blood Cancer Journal**, 11, n. 4, p. 69, 2021/04/06 2021.

STRATI, P.; JAIN, N.; O'BRIEN, S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, 93, n. 5, p. 651-664, 2018/05/01/ 2018.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 3, p. 209-249, May 2021.

SWINGLE, K. L.; HAMILTON, A. G.; MITCHELL, M. J. Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of mRNA Therapeutics and Vaccines. **Trends in Molecular Medicine**, 27, n. 6, p. 616-617, 2021/06/01/ 2021.

THATTE, A. S.; HAMILTON, A. G.; NACHOD, B. E.; MUKALEL, A. J. *et al.* mRNA Lipid Nanoparticles for Ex Vivo Engineering of Immunosuppressive T Cells for Autoimmunity Therapies. **Nano Letters**, 23, n. 22, p. 10179-10188, 2023/11/22 2023.

TOMBÁČZ, I.; LACZKÓ, D.; SHAHNAWAZ, H.; MURAMATSU, H. *et al.* Highly efficient CD4⁺ T cell targeting and genetic recombination using engineered CD4⁺ cell-homing mRNA-LNPs. **Mol Ther**, 29, n. 11, p. 3293-3304, Nov 3 2021.

TURKSEN, K.; TROY, T. C. Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. **Dev Dyn**, 222, n. 2, p. 292-300, Oct 2001.

TURTLE, C. J.; HAY, K. A.; HANAFI, L.-A.; LI, D. *et al.* Durable molecular remissions in chronic lymphocytic leukemia treated with CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells after failure of ibrutinib. **Journal of Clinical Oncology**, 35, n. 26, p. 3010, 2017.

VONNIESSEN, B.; TABARIÈS, S.; SIEGEL, P. M. Antibody-mediated targeting of Claudins in cancer. **Front Oncol**, 14, p. 1320766, 2024.

WAGNER, D. L.; FRITSCH, E.; PULSIPHER, M. A.; AHMED, N. *et al.* Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, p. 1-15, 2021.

WALDMAN, A. D.; FRITZ, J. M.; LENARDO, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. **Nature Reviews Immunology**, 20, n. 11, p. 651-668, 2020/11/01 2020.

WANG, D. W.; ZHANG, W. H.; DANIL, G.; YANG, K. *et al.* The role and mechanism of claudins in cancer. **Front Oncol**, 12, p. 1051497, 2022.

WANG, V.; GAUTHIER, M.; DECOT, V.; REPPEL, L. *et al.* Systematic Review on CAR-T Cell Clinical Trials Up to 2022: Academic Center Input. **Cancers (Basel)**, 15, n. 4, Feb 4 2023.

WANG, X.; LIU, S.; SUN, Y.; YU, X. *et al.* Preparation of selective organ-targeting (SORT) lipid nanoparticles (LNPs) using multiple technical methods for tissue-specific mRNA delivery. **Nature Protocols**, 18, n. 1, p. 265-291, 2023/01/01 2023.

WEBB, E. S.; LIU, P.; BALEEIRO, R.; LEMOINE, N. R. *et al.* Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. **J Biomed Res**, 32, n. 5, p. 317-326, Sep 29 2018.

WEI, J.; GUO, Y.; WANG, Y.; WU, Z. *et al.* Clinical development of CAR T cell therapy in China: 2020 update. **Cellular & Molecular Immunology**, 18, n. 4, p. 792-804, 2021/04/01 2021.

WIESINGER, M.; MÄRZ, J.; KUMMER, M.; SCHULER, G. *et al.* Clinical-Scale Production of CAR-T Cells for the Treatment of Melanoma Patients by mRNA Transfection of a CSPG4-Specific CAR under Full GMP Compliance. **Cancers**, 11, n. 8, p. 1198, 2019.

XUE, L.; THATTE, A. S.; MAI, D.; HALEY, R. M. *et al.* Responsive biomaterials: optimizing control of cancer immunotherapy. **Nature Reviews Materials**, 9, n. 2, p. 100-118, 2024/02/01 2024.

YI, G.; LIU, H.; SUN, F.; DU, R. *et al.* Intratumor Injection of Thermosensitive Polypeptide with Resveratrol Inhibits Glioblastoma Growth. **Tissue Eng Part C Methods**, 29, n. 3, p. 103-109, Mar 2023.

YIN, H.; KANASTY, R. L.; ELTOUKHY, A. A.; VEGAS, A. J. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, 15, n. 8, p. 541-555, 2014/08/01 2014.

YU, Y.; CHO, H. I.; WANG, D.; KAOSAARD, K. *et al.* Adoptive transfer of Tc1 or Tc17 cells elicits antitumor immunity against established melanoma through distinct mechanisms. **J Immunol**, 190, n. 4, p. 1873-1881, Feb 15 2013.

ZHANG, R.; ZHANG, Z.; LIU, Z.; WEI, D. *et al.* Adoptive cell transfer therapy for hepatocellular carcinoma. **Frontiers of medicine**, 13, n. 1, p. 3-11, 2019.

ZHANG, Y.; PEI, P.; ZHOU, H.; XIE, Y. *et al.* Nattokinase-Mediated Regulation of Tumor Physical Microenvironment to Enhance Chemotherapy, Radiotherapy, and CAR-T Therapy of Solid Tumor. **ACS Nano**, 17, n. 8, p. 7475-7486, Apr 25 2023.

ZHOU, J. E.; SUN, L.; JIA, Y.; WANG, Z. *et al.* Lipid nanoparticles produce chimeric antigen receptor T cells with interleukin-6 knockdown in vivo. **J Control Release**, 350, p. 298-307, Oct 2022.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido

Projeto de Pesquisa: “Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias hematológicas/não hematológicas”

Sub-projeto de Pesquisa: “Uso de uma plataforma de nanopartículas lipídicas para a geração de linfócitos CAR T usados na terapia de neoplasias hematológicas”

Prezado (a) Senhor (a),

O (a) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar do estudo “Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias hematológicas/não hematológicas”. Este, é um estudo de interesse na avaliação de diagnóstico, prognóstico das neoplasias mielóides, linfóides e mielodisplasias/tumores sólidos. Caso concorde em participar desse estudo, solicitamos que autorize o uso de parte de seu sangue, coletado no braço (punção venosa) e parte do seu sangue da medula (quando solicitado por seu médico), que são coletados rotineiramente pela equipe que o assiste, como parte da avaliação conduzida e solicitada pelo seu médico assistente. As amostras serão utilizadas para realizarmos exames laboratoriais que incluirão dosagens de proteínas, exames genéticos e testes com biomoléculas, importantes parâmetros para o diagnóstico, avaliação de prognóstico e descoberta de novas drogas para tratamento destas doenças.

Se você concordar, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa consultarão seus dados clínicos e laboratoriais que se encontram no seu prontuário. Os pesquisadores poderão utilizar também parte do material que será armazenado em nosso Biorepositório do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, assim como parte do material restante armazenado nos laboratórios especializados que auxiliaram no diagnóstico da sua doença (isto é, lâminas, blocos de parafina, material congelado etc.).

Para realizar o diagnóstico de câncer é necessário que uma parte de seu tumor ou de

seu sangue sejam coletados para exames laboratoriais. Estes procedimentos são necessários para um diagnóstico correto e para a escolha de um tratamento adequado. Os materiais não utilizados, ou aqueles que sobram dos exames, são descartados conforme a Legislação Sanitária. Na ocasião desses procedimentos, e só após a sua autorização, uma pequena amostra excedente de seu tumor ou de seu sangue (aquela que está sobrando e que iria ser descartada), poderá ser utilizada para esta pesquisa. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico uma vez que a parte principal destes materiais será encaminhada ao laboratório responsável pelos exames laboratoriais de rotina para o diagnóstico.

Se você concordar em participar desta pesquisa, os pesquisadores poderão utilizar uma parte excedente (que está sobrando) de seu tumor ou de seu sangue para realizar exames laboratoriais complementares para esta pesquisa.

Benefícios

Você não será remunerado por sua participação e esta pesquisa poderá não oferecer benefícios diretos a você. Se você concordar com o uso de suas informações e/ou do material do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes desta pesquisa.

O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, o diagnóstico e o tratamento para esse tipo de câncer beneficiem outros pacientes.

Riscos

Não existem riscos físicos adicionais a você pela sua participação nesta pesquisa. Os materiais utilizados nessa pesquisa serão somente aqueles considerados excedentes dos coletados para exames laboratoriais de rotina para o seu diagnóstico. Os riscos físicos e inconvenientes não serão diferentes daqueles previstos durante os procedimentos normais para a obtenção de amostras biológicas para o diagnóstico da sua doença. O seu médico irá informá-la em detalhes sobre os riscos associados aos procedimentos adicionais de biópsia e da coleta de sangue, uma vez que o nível do risco dependerá de onde o(s) tumor(es) está(ão) localizado(s) no seu corpo. De maneira geral, fazer uma biópsia causa dor, inchaço, sangramento e/ou infecção no local onde a agulha da biópsia penetra na sua pele; se seu médico decidir usar anestesia, pode ocorrer reação alérgica.

Os prováveis riscos e efeitos adversos (efeitos danosos) de se realizar uma biópsia incluem: sangramento e dor no local onde a agulha foi inserida, um inchaço debaixo da pele que contém sangue (hematoma), sonolência, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. De maneira menos provável, porém de riscos sérios, os efeitos colaterais em se submeter a uma biópsia incluem: infecção, falta de ar, baixa frequência cardíaca e baixa pressão arterial, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha.

Confidencialidade

Se você optar por participar desta pesquisa, as informações sobre a sua saúde e seus dados pessoais serão mantidas de maneira confidencial e sigilosa. Seus dados somente serão utilizados depois de anonimizados (ou seja, sem sua identificação). Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes bem como às informações do seu registro médico. Mesmo que estes dados sejam utilizados para propósitos de divulgação e/ou publicação científica, sua identidade permanecerá em segredo.

Custos

Se você concordar com o uso da parte de seu tumor e/ou sangue armazenados e/ou das informações do seu prontuário como descrito acima, você não terá quaisquer custos ou despesas (gastos) pela sua participação nessa pesquisa. Você não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou teste exigido como parte desta pesquisa.

Acesso aos resultados de exames

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao seu médico e ele os discutirá com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos mesmos.

Garantia de esclarecimentos

A pessoa responsável pela obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso,

por favor, ligue para o(a) o Prof. Adriano de Paula Sabino no telefone 3134096882 das 10:00 às 15:00 hs ou email para: adriansabin@ufmg.br. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG, que está formado por profissionais de diferentes áreas, que revisam os projetos de pesquisa que envolvem seres humanos, para garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos as pessoas que se voluntariam à participar destes. Se tiver perguntas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizado à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG. ou também pelo e-mail: coep@prpq.ufmg.br. Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo que uma via ficará com você e outra será arquivada com os pesquisadores responsáveis.

Consentimento

Li as informações acima e entendi o propósito da solicitação de permissão para o uso das informações contidas no meu registro médico e de parte de meu tumor e/ou meu sangue obtidos durante o atendimento nesse hospital. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas

Ficaram claros para mim quais são procedimentos a serem realizados, riscos e a garantia de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos dados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que meu nome não será publicado e toda tentativa será feita para assegurar o meu anonimato.

Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

() Eu concordo em participar desta pesquisa e **CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas e utilizadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar.

ou

() Eu concordo em participar desta pesquisa, mas **NÃO CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas para uso em pesquisas futuras.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar nesta pesquisa.

Nome e Assinatura do participante	/ / Data
Nome e Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial (quando pertinente)	/ / Data

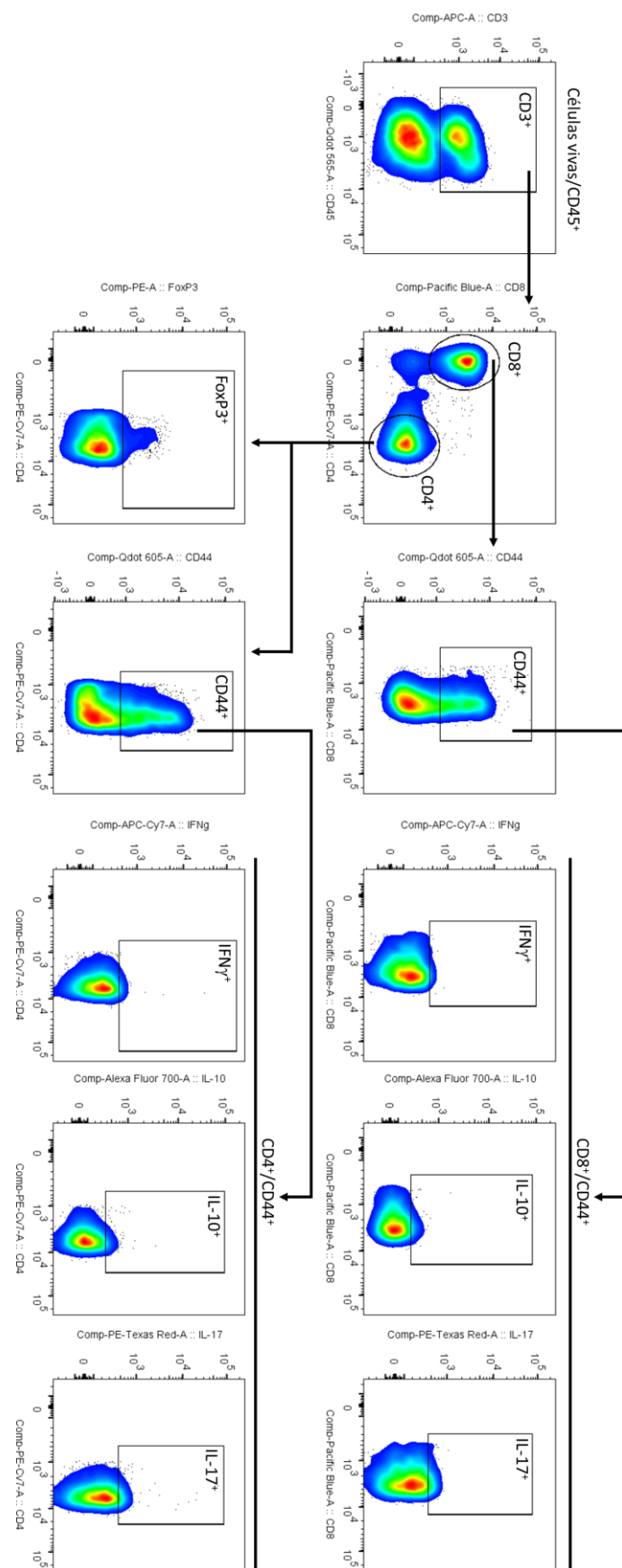
Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação desta pesquisa.

Nome e Assinatura do Responsável pela obtenção do Termo	/ / Data
---	---------------

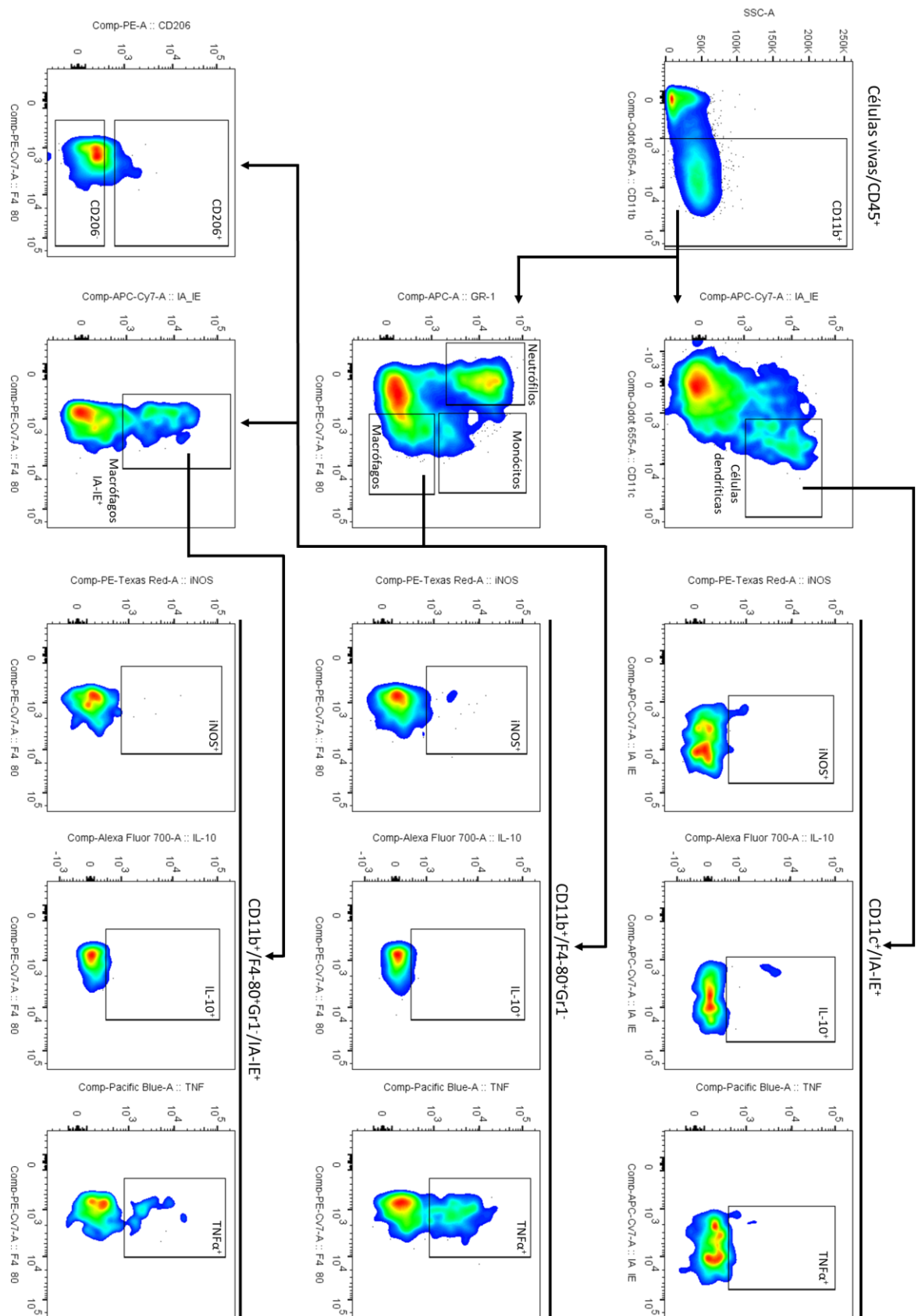
Referencias:

1. Resolução CNS 441/11, itens 2.II e 6 e na Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5º e Capítulo III, Artigo 8
2. Resolução no 466, de 12 de dezembro de 2012
3. Modelo de TCLE/INCA: disponível em: www.inca.gov.br

10.3. Anexo II – Estratégia de análise para identificação de linfócitos



10.4. Anexo III – Estratégia de análise para identificação de células mieloides



10.5. Anexo IV – Artigo relacionado a tese



International Journal of Nanomedicine

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/dijn20>



Delivery of Plasmid DNA by Ionizable Lipid Nanoparticles to Induce CAR Expression in T Cells

Pedro Henrique Dias Moura Prazeres, Heloísa Ferreira, Pedro Augusto Carvalho Costa, Walison da Silva, Marco Túlio Alves, Marshall Padilla, Ajay Thatte, Anderson Kenedy Santos, Anderson Oliveira Lobo, Adriano Sabino, Helen Lima Del Puerto, Michael J Mitchell & Pedro Pires Goulart Guimaraes

To cite this article: Pedro Henrique Dias Moura Prazeres, Heloísa Ferreira, Pedro Augusto Carvalho Costa, Walison da Silva, Marco Túlio Alves, Marshall Padilla, Ajay Thatte, Anderson Kenedy Santos, Anderson Oliveira Lobo, Adriano Sabino, Helen Lima Del Puerto, Michael J Mitchell & Pedro Pires Goulart Guimaraes (2023) Delivery of Plasmid DNA by Ionizable Lipid Nanoparticles to Induce CAR Expression in T Cells, International Journal of Nanomedicine, , 5891-5904, DOI: [10.2147/IJN.S424723](https://doi.org/10.2147/IJN.S424723)

To link to this article: <https://doi.org/10.2147/IJN.S424723>



© 2023 Prazeres et al.



Published online: 19 Oct 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 142



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dijn20>

10.6. Anexo V – Auxílio viagem para congresso internacional



The Controlled Release Society

1120 Route 73, Suite 200

Mt. Laurel, NJ 08054

Tel: +1-856-439-0500

Fax: +1-856-439-0525

Email: info@controlledreleasesociety.org

Web: www.controlledreleasesociety.org

5/16/2023

Dear Pedro Henrique Dias Moura Prazeres,

Congratulations! The International Committee has reviewed your Local Chapter's application that listed you as a nominee.

We are pleased to award you \$2000 through your Local Chapter for your excellent work as a young scientist and to attend the 2023 CRS Annual Meeting in Las Vegas Nevada.

The primary aim of these funds is to award Local Chapters Young Scientist Travel Grants by recognizing their excellence in science and to give them the opportunity to attend the CRS Annual Meeting to present their research.

Your grant will be provided to you following the conclusion of the Annual Meeting. You will receive further instructions on how to submit your travel receipts for reimbursement following the meeting.

Warmest regards,

Leah McGonigle

Assistant Executive Director

Controlled Release Society

1120 Route 73, Suite 200

Mt. Laurel, NJ 08054

lmgonigle@controlledreleasesociety.org

10.7. Anexo VI – Relevância acadêmica



CERTIFICATE

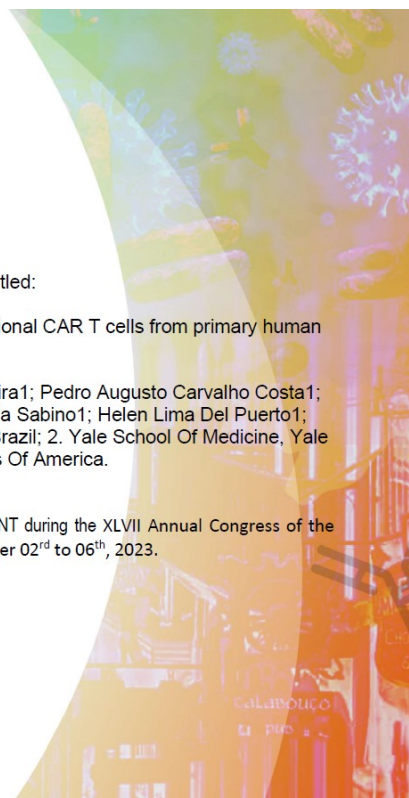
We hereby certify that the abstract entitled:

pDNA delivery mediated by ionizable lipid nanoparticles generates functional CAR T cells from primary human lymphocytes

Pedro Henrique Dias Moura Prazeres¹; Heloisa Athaydes Seabra Ferreira¹; Pedro Augusto Carvalho Costa¹; Walison Nunes da Silva¹; Anderson Kenedy Santos²; Adriano de Paula Sabino¹; Helen Lima Del Puerto¹; Pedro Pires Goulart Guimaraes¹. 1. Ufmg, Ufmg Belo Horizonte - MG - Brazil; 2. Yale School Of Medicine, Yale School Of Medicine New Haven - United States Of America.

Was selected as a "POSTER of DISTINTIC" in the category PH.D GRADUTE STUDENT during the XLVII Annual Congress of the Brazilian Society of Immunology, in Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, from October 02nd to 06th, 2023.

Ana Maria Caetano de Faria
President of the Brazilian Society of Immunology (SBI)



10.8. Anexo VII – Artigo colaboração

Biomedicine & Pharmacotherapy 170 (2024) 115981



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph



siRNA lipid nanoparticles for CXCL12 silencing modulate brain immune response during Zika infection

Pedro Augusto Carvalho Costa ^a, Walison Nunes da Silva ^a,
Pedro Henrique Dias Moura Prazeres ^{a,b}, Heloísa Athaydes Seabra Ferreira ^a,
Natália Jordana Alves da Silva ^a, Maria Marta Figueiredo ^c, Bruna da Silva Oliveira ^d,
Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior ^a, Felipe Rocha da Silva Santos ^e,
Rúbia Aparecida Fernandes ^d, Rohan Palanki ^f, Alex G. Hamilton ^f, Alexander Birbrair ^g, Victor
Rodrigues Santos ^d, Aline Silva de Miranda ^d, Michael J. Mitchell ^f, Mauro Martins Teixeira ^e,
Vivian Vasconcelos Costa ^d, Pedro Pires Goulart Guimarães ^{a,*}

^a Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

^b Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c State University of Minas Gerais, Divinópolis 35501-170, Brazil

^d Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

^e Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

^f Department of Bioengineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, 19104-6321, United States

^g Department of Dermatology, University of Wisconsin-Madison, WI 53706, United States

ARTICLE INFO

Keywords:

Neuroimmunomodulation
CXCL12
Zika virus
Lipid nanoparticle
siRNA

ABSTRACT

CXCL12 is a key chemokine implicated in neuroinflammation, particularly during Zika virus (ZIKV) infection. Specifically, CXCL12 is upregulated in circulating cells of ZIKV infected patients. Here, we developed a lipid nanoparticle (LNP) to deliver siRNA in vivo to assess the impact of CXCL12 silencing in the context of ZIKV infection. The biodistribution of the LNP was assessed in vivo after intravenous injection using fluorescently tagged siRNA. Next, we investigated the ability of the developed LNP to silence CXCL12 in vivo and assessed the resulting effects in a murine model of ZIKV infection. The LNP encapsulating siRNA significantly inhibited CXCL12 levels in the spleen and induced microglial activation in the brain during ZIKV infection. This activation was evidenced by the enhanced expression of iNOS, TNF- α , and CD206 within microglial cells. Moreover, T cell subsets exhibited reduced secretion of IFN- γ and IL-17 following LNP treatment. Despite no observable alteration in viral load, CXCL12 silencing led to a significant reduction in type-I interferon production compared to both ZIKV-infected and uninfected groups. Furthermore, we found grip strength deficits in the group treated with siRNA-LNP compared to the other groups. Our data suggest a correlation between the upregulated pro-inflammatory cytokines and the observed decrease in strength. Collectively, our results provide evidence that CXCL12 silencing exerts a regulatory influence on the immune response in the brain during ZIKV infection. In addition, the modulation of T-cell activation following CXCL12 silencing provides valuable insights into potential protective mechanisms against ZIKV, offering novel perspectives for combating this infection.

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus that can cause neuropathogenesis in adults and fetal central nervous system (CNS) malformation following infection in pregnant women [1–4]. ZIKV infection was declared a

global disease after its outbreak in 2016 [5]. The mechanisms underlying ZIKV pathogenesis remain poorly understood and seem to involve a complex interplay between viral and host factors [6]. ZIKV has been shown to modulate both the innate and adaptive immune response to escape and trigger neuropathogenesis [2,3,7,8,9]. ZIKV-induced

* Corresponding author.

E-mail address: ppiresgo@reitoria.ufmg.br (P.P.G. Guimarães).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2023.115981>

Received 9 October 2023; Received in revised form 28 November 2023; Accepted 2 December 2023

Available online 12 December 2023

0753-3322/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

10.9. Anexo VIII – Artigo colaboração



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb



Research paper

In situ triggered, floating delivery systems of capsaicin for prolonged gastroprotection

Konstantina Chachlioutaki^{a,b}, Pedro H.D.M. Prazeres^c, Sérgio R.A. Scalzo^c, Pelagia Bakirtzi^a, Samson Afewerki^d, Pedro P.G. Guimaraes^c, Nikolaos Bouropoulos^{e,f}, Dimitrios G. Fatouros^{a,b}, Christina Karavasili^{a,*}

^a Department of Pharmacy Division of Pharmaceutical Technology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

^b Center for Interdisciplinary Research and Innovation (CIRI-AUTH), Thessaloniki, Greece

^c Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

^d Torngry Södersunds Allé 48, 756 44 Uppsala, Sweden

^e Department of Materials Science, University of Patras, GR-26504 Patras, Greece

^f Foundation for Research and Technology Hellas, Institute of Chemical Engineering and High Temperature Chemical Processes, GR-26504 Patras, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:
Floating drug delivery systems
Gastroretentive dosage forms
Electrospinning
Peptic ulcers
Capsaicin

ABSTRACT

Capsaicin (CAP) has been implicated as a gastroprotective agent in the treatment of peptic ulcers. However, its oral administration is hampered by its poor aqueous solubility and caustic effect at high administered doses. To address these limitations, we describe the development of gastric floating, sustained release electrospun films loaded with CAP. The nanofiber films were formulated using the polymers Eudragit RL/RS and sodium bicarbonate (SB) as the effervescent agent. The films were tested for their physicochemical properties, and film buoyancy and *in vitro* release of CAP were assessed in simulated gastric fluid. The cytocompatibility and anti-inflammatory properties of the films were evaluated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Caco-2 cells. The amorphous films showed improved wettability, a short floating lag time (<1 s) and a total floating time of over 24 h accompanied by sustained CAP release for up to 24 h. CAP-loaded films demonstrated biocompatibility with Caco-2 cells and potential cytoprotective effects by attenuating inflammatory cytokine and reactive oxygen species (ROS) production in LPS-stimulated Caco-2 cells. The gastric floating electrospun films could serve as a platform for sustained and stomach-specific drug delivery applications.

1. Introduction

Peptic ulcer disease (PUD) is one of the most common digestive disorder affecting the mucosal integrity of the stomach and proximal duodenum [1]. Its pathophysiology generally stems from an imbalance between the aggressive factors causing PUD and the protective mechanisms of the gastric mucosa and is associated with various changes in physiological parameters that may induce oxidative stress, lipid peroxidation and excessive gastric acid secretion. Among the most common causes of PUD are the chronic use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and increased activity of the gastric secretory cells (Zollinger-Ellison syndrome) [2]. Owing to the fact that approximately 70 % of PUD cases may be asymptomatic or exert nonspecific symptoms, diagnosis and treatment require clinical attention to avoid PUD-related complications including

hemorrhage, perforation and gastric obstruction [3].

Eradication of *H. pylori* infection is the standard of care for the management of PUD. However, the global prevalence of *H. pylori* antibiotic resistance increases the risk of gastric cancer and the emergence of new multidrug-resistant bacterial strains [4]. With the risk factors of PUD experiencing a gradual shift from bacterial-related to drug-related cases, the use of H₂-antagonists and proton pump inhibitors (PPIs) has increased [5]. Although antisecretory drugs have been used for years to treat gastric disorders, long-term PPI treatment may be associated with certain medication risks, such as elevated risk of fracture [6]. In search of alternative gastroprotective agents of natural origin, curcumin [7] and CAP [2] have been identified for their anti-ulcer effects through the attenuation of different ulcerative effectors, which are further complemented by fewer side effects and a significantly lower cost.

An ideal gastroprotective strategy should enable prolonged retention

* Corresponding author.

E-mail address: karavasci@pharm.auth.gr (C. Karavasili).

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114212>

Received 15 December 2023; Received in revised form 24 January 2024; Accepted 5 February 2024

Available online 10 February 2024

0939-6411/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

10.9. Anexo IX – Artigo colaboração

Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated TRAIL mRNA Delivery in the Tumor Microenvironment to Inhibit Colon Cancer Progression

Walison Nunes da Silva¹, Pedro Augusto Carvalho Costa¹, Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior¹,
 Heloísa AS Ferreira¹, Pedro Henrique Dias Moura Prazeres²,
 Caroline Leonel Vasconcelos Campos³, Marco Túlio Rodrigues Alves¹,
 Natália Jordana Alves da Silva¹, Ana Luiza de Castro Santos¹, Lays Cordeiro Guimarães¹,
 Maria Eduarda Chen Ferris¹, Ajay Thatte⁴, Alex Hamilton⁴, Kelly Alves Bicalho⁵,
 Anderson Oliveira Lobo⁶, Helton da Costa Santiago³, Lucíola da Silva Barcelos¹,
 Maria Marta Figueiredo⁷, Mauro Martins Teixeira³, Vivian Vasconcelos Costa⁸, Michael J Mitchell⁴,
 Frédéric Frézard¹, Pedro Pires Goulart Guimaraes¹

¹Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ²Department of Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil; ³Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil; ⁴Department of Bioengineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA; ⁵Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁶Department of Materials Engineering, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil; ⁷State University of Minas Gerais, Divinópolis, MG, Brazil; ⁸Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence: Pedro Pires Goulart Guimaraes, Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, Email ppiresgo@reitoria.ufmg.br

Introduction: Immunotherapy has revolutionized cancer treatment by harnessing the immune system to enhance antitumor responses while minimizing off-target effects. Among the promising cancer-specific therapies, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) has attracted significant attention.

Methods: Here, we developed an ionizable lipid nanoparticle (LNP) platform to deliver TRAIL mRNA (LNP-TRAIL) directly to the tumor microenvironment (TME) to induce tumor cell death. Our LNP-TRAIL was formulated via microfluidic mixing and the induction of tumor cell death was assessed in vitro. Next, we investigated the ability of LNP-TRAIL to inhibit colon cancer progression in vivo in combination with a TME normalization approach using Losartan (Los) or angiotensin 1–7 (Ang(1–7)) to reduce vascular compression and deposition of extracellular matrix in mice.

Results: Our results demonstrated that LNP-TRAIL induced tumor cell death in vitro and effectively inhibited colon cancer progression in vivo, particularly when combined with TME normalization induced by treatment Los or Ang(1–7). In addition, potent tumor cell death as well as enhanced apoptosis and necrosis was found in the tumor tissue of a group treated with LNP-TRAIL combined with TME normalization.

Discussion: Together, our data demonstrate the potential of the LNP to deliver TRAIL mRNA to the TME and to induce tumor cell death, especially when combined with TME normalization. Therefore, these findings provide important insights for the development of novel therapeutic strategies for the immunotherapy of solid tumors.

Keywords: immunotherapy, TRAIL, mRNA, lipid nanoparticle, losartan, angiotensin (1–7)

Introduction

Cancer therapy has undergone a remarkable transformation with the introduction of immunotherapy. This groundbreaking approach utilizes specialized therapies to enhance antitumor immune responses against cancerous cells with reduced effects on healthy tissues, ensuring more focused and safer treatments.^{1,2} Despite significant advances in treatments,

10.9. Anexo X – Patente



16/06/2023 870230051752
15:32

29409161957242557

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 012043 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/06/2023 às 15:32, Petição 870230051752

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÕES PARA ENTREGA SELETIVA DE DNA OU DNA PLASMIDIAL EM LINFÓCITOS T, E USO

Resumo: A presente tecnologia trata de composições para entrega eficiente e seletiva de DNA para linfócitos T. As composições compreendem nanopartículas lipídicas ionizáveis (LNPs) carregadas com DNA ou DNA plasmidial, formadas por, no mínimo, um lipídio ionizável, um lipídio auxiliar, colesterol e um lipídio conjugado a PEG, e uma seleção da razão em massa de lipídio ionizável:DNA, que definem a entrega específica para Linfócitos T. As composições podem ser utilizadas para produção de medicamentos para entrega seletiva de DNA e DNA plasmidial em linfócitos T por diferentes vias de administração.

Figura a publicar: 2

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/06/2023 às 15:32, Petição 870230051752

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3**Nome:** PEDRO PIRES GOULART GUIMARAES**CPF:** 01431132675**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Av. Pres. Antônio Carlos, 6627**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 340 94774**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br**Inventor 2 de 3****Nome:** PEDRO HENRIQUE DIAS MOURA PRAZERES**CPF:** 12361943654**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** Av. Pres. Antônio Carlos, 6627**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 340 94774**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br**Inventor 3 de 3****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/06/2023 às 15:32, Petição 870230051752

Nome: HELOÍSA ATHAYDES SEABRA FERREIRA

CPF: 08917607683

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 94774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	1 - Comprovante de pagamento - 29409161957242557.pdf
Portaria	2 - Portaria 2195-2020 - Prof. Gilberto UFMG.pdf
Relatório Descritivo	3 - Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	4 - Reivindicações.pdf
Desenho	5 - Desenhos.pdf
Resumo	6 - Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/06/2023 às 15:32, Petição 870230051752